

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE TIEMI YAMAGUSHI

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS E  
PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRESENTES NO COLOSTRO  
BOVINO PARA APLICAÇÕES EM PRODUTOS FUNCIONAIS E  
NUTRACÊUTICOS**

CURITIBA

2013

CAROLINE TIEMI YAMAGUISHI

**VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS E  
PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRESENTES NO COLOSTRO  
BOVINO PARA APLICAÇÕES EM PRODUTOS FUNCIONAIS E  
NUTRACÊUTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação  
em Processos Biotecnológicos, Setor de Tecnologia  
da Universidade Federal do Paraná, como requisito  
parcial para obtenção do título de Doutora em  
Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Ricardo Soccol

CURITIBA

2013

## RELATÓRIO DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Aos quatorze dias do mês de novembro de 2013, no Salão Nobre do Setor de Tecnologia, Segundo Andar do Prédio da Administração do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná, Jardim das Américas, foi instalada pela Profª Drª Luciana Porto de Souza Vandenberghe, Coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, a banca examinadora para a Octuagésima Nona Defesa de Tese de Doutorado, Área de Concentração: Saúde Humana e Animal. Estiveram presentes no Ato, além da Coordenadora do Curso de Pós-Graduação, professores, alunos e visitantes.

A Banca Examinadora, atendendo determinação do colegiado do Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, ficou constituída pelos Professores Doutores Aristóteles Góes Neto (UEFS), Elza louko Ida (UEL), Hervé Louis Ghislain Rogez (UFPA), Juliano de Dea Lindner (UFSC), Adenise Lorenci Woiciechowski (UFPR), e Carlos Ricardo Soccol (UFPR - orientador da tese).

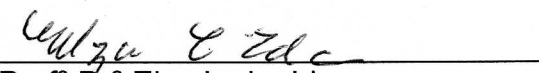
Às 8h30, a banca iniciou os trabalhos, convidando a candidata **Caroline Tiemi Yamaguishi** a fazer a apresentação da Tese intitulada: **"VALORIZAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE COMPOSTOS BIOATIVOS E PROSPECÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS PRESENTES NO COLOSTRO BOVINO PARA APLICAÇÕES EM PRODUTOS FUNCIONAIS E NUTRACÊUTICOS"**. Encerrada a apresentação, iniciou-se a fase de arguição pelos membros participantes.

Tendo em vista a tese e a arguição, a banca composta pelos professores Dr Aristóteles Góes Neto, Drª Elza louko Ida, Dr Hervé Louis Ghislain Rogez, Dr Juliano de Dea Lindner, Drª Adenise Lorenci Woiciechowski, e Dr Carlos Ricardo Soccol declarou a candidata APROVADA (de acordo com a determinação dos Artigos 59 a 68 da resolução 65/09 de 30.10.09).


Curitiba, 14 de novembro de 2013



Prof Dr Aristóteles Góes Neto



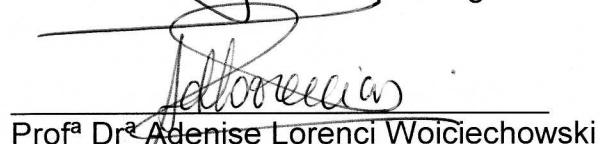
Profª Drª Elza louko Ida




Prof Dr Hervé Louis Ghislain Rogez



Prof Dr Juliano de Dea Lindner



Profª Drª Adenise Lorenci Woiciechowski



Prof Dr Carlos Ricardo Soccol

## RESUMO

O colostro bovino faz parte da cadeia produtiva do leite e consiste de uma secreção glandular obtida das fêmeas durante os primeiros dias após o nascimento do bezerro. Este líquido possui concentração superior de nutrientes, especialmente de proteínas funcionais, em relação ao leite. Considerando que, grande parte do colostro produzido é descartado nas fazendas leiteiras, e que o colostro possui um alto valor biológico, este subproduto pode apresentar grande aplicação no desenvolvimento de novos alimentos nutracêuticos e funcionais. Dessa forma, este trabalho teve por objetivo a agregação de valor do colostro bovino através do desenvolvimento de um produto em pó, contendo componentes funcionais como a imunoglobulina G (IgG) e outros fatores que promovem benefícios a saúde, bem como a prospecção de microrganismos probióticos presentes. Este trabalho foi dividido em quatro capítulos que abordam a caracterização físico-química do colostro bovino, o uso de técnicas moleculares para o isolamento e identificação da microflora láctica do colostro, o estudo de técnicas para a purificação das imunoglobulinas G e estudos de estabilidade e formulação de um produto a base de imunoglobulina G. No capítulo 1, o perfil físico-químico de 15 amostras de colostro de bovinos da raça holandesa, coletadas na região metropolitana de Curitiba, foi definido através de análises de extrato seco, cinzas, proteína, gordura, lactose, densidade e acidez, seguindo as metodologias estabelecidas pela AOAC (*Association of Official Analytical Chemists*). As maiores variações ocorreram da primeira (após o parto) para a segunda ordenha (12 h pós-parto), sendo a segunda ordenha similar a terceira ordenha (24 h pós-parto). As variáveis mais influenciadas pela ordenha foram o teor de cinzas, proteínas e lactose. A fração lipídica foi extraída e estimada em ésteres metilados de ácidos graxos (FAME). A maioria dos ácidos graxos foi representada pelo ácido palmítico (36,9%), sendo verificada também a presença do ácido linoleico (2,63%). No capítulo 2, o estudo da microflora láctica do colostro foi realizado pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e pelo método de LH-PCR (*Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction*). No primeiro método, 29 cepas foram isoladas em meios MPCA, M17 e MRS suplementado com cisteína. Dentre elas, 13 espécies cultivadas foram identificadas pelas sequências do gene 16S rRNA. A LH-PCR confirmou a presença de algumas espécies isoladas em placa (*L. casei* e *Staphylococcus* sp.), no entanto, outras espécies não recuperadas nos meios de cultivo foram identificadas pelos picos (*Lactococcus lactis*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus thermophilus* e *Kocuria kristinae*). No capítulo 3, 18 amostras de colostro bovino foram quantificadas

quanto ao teor de imunoglobulinas G total, através da técnica de imunodifusão radial. As amostras de colostro apresentaram uma alta concentração de IgG (37,59 a 110,25 g/L). O estudo de diferentes técnicas para a purificação das imunoglobulinas G foi realizado testando-se 4 métodos que foram a micro e ultrafiltração, filtração em carvão ativado, precipitação com sulfato de amônio e gel filtração do soro de colostro. Todos os processos levaram a reduções nos teores de proteínas e IgGs, sendo que o maior rendimento em IgGs foi alcançado pela filtração em coluna de carvão (57,2%) e com o uso de membranas de 0,22 µm, recuperando-se a fração do retentado (45,5%) (*Pool 1*). A reprodutibilidade dos processos foi avaliada em 3 *pools* de colostro e verificou-se que o retentado de 0,22 µm foi o único que não apresentou diferença significativa em relação ao soro dialisado, e este tratamento foi, portanto, selecionado para a elaboração do produto. Todos os tratamentos mostraram a presença das bandas de 25 e 50 kDa, confirmando a recuperação da molécula de IgG. No capítulo 4, os testes de pasteurização e liofilização não indicaram uma redução no teor das IgGs. No entanto, quando os lioprotetores foram testados verificou-se uma maior estabilidade das IgGs no uso de uma solução de exopolissacarídeo (EPS) a 1% (p/v). O produto elaborado apresentou uma alta composição em IgG bovina (78%), compondo 77% das proteínas totais. Testes de estabilidade confirmaram a manutenção da concentração das IgGs em 30 dias de armazenamento a 20-25°C. Concluiu-se, portanto, que o processamento e utilização do colostro bovino em novas formulações têm aplicações relevantes e de interesse para a indústria. O produto desenvolvido requer uma dose diária inferior (menor que 5 gramas) a recomendada para os produtos já disponíveis no mercado e poderia ser destinado a diversos segmentos como na nutrição de pacientes imunodeprimidos, na melhora da performance atlética e como suplemento em alimentos infantis.

**Palavras-chave:** colostro bovino, LH-PCR, imunoglobulina G, proteína do soro, sistema imune, imunodifusão radial.

## ABSTRACT

The bovine colostrum is part of the production chain of milk and consists of a glandular secretion obtained from females during the first days after birth of the calf. This liquid has higher concentration of nutrients, especially functional proteins compared to milk. Whereas largely colostrum produced is disposed on dairy farms and, it has a high biological value, this by-product may have a high application in the development of new functional foods and nutraceuticals. Thus, this study aimed to add value to colostrum through the development of a powder product containing functional components such as immunoglobulin G (IgG) and other factors that promote health benefits as well as the prospecting of present probiotic microorganisms. This manuscript was divided into four chapters that approach the physicochemical characterization of bovine colostrum, the use of molecular techniques for the isolation and identification of the lactic microflora of colostrum, the study of techniques for the purification of immunoglobulin G and stability studies and formulation a product based on immunoglobulin G. In chapter 1, the physical-chemical profile of 15 samples of colostrum from Holsteins cows, collected in the metropolitan region of Curitiba, was defined based on analysis of solids, ash, protein, fat, lactose, density and, acidity according to methodology of AOAC (Association of Official Analytical Chemists). The analyzes showed the greatest variation between the first (postpartum) and second milking (12 hours postpartum), where the second milking was very similar to third milking (24 hours postpartum). The variables more influenced by milking were the ash, protein and, lactose content. The lipid fraction was extracted and estimated in fatty acid methylated esters (FAME). Most fatty acids have been represented by palmitic acid (36.9%), and it was also verified the presence of linoleic acid (2.63%). In chapter 2, the study of the lactic microflora of colostrum was performed by sequencing the 16S rRNA and the LH-PCR (Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction). In the first method, 29 strains were isolated in medium MPCA, M17 and MRS supplemented with cysteine. Among them, 13 cultivated species were identified by 16S rRNA gene sequences. LH-PCR confirmed the presence of some species isolated plate (*L. casei* e *Staphylococcus* sp.), however, other species could not recovered in culture media were identified by peaks (*Lactococcus lactis*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus thermophilus* and *Kocuriakristinae*). In chapter 3, 18 samples of colostrum were quantified for immunoglobulin G total content by radial immunodiffusion. Samples of colostrum showed a high concentration of IgG (37.59 to 110.25 g/L). The study of different methods for purification

of immunoglobulin G was performed by testing four methods that were micro and ultra filtration, activated carbon filtration, precipitation with ammonium sulfate and, gel filtration of whey colostrum. All processes have led to reduction in levels of proteins and IgG, and the highest IgG yield was achieved by filtration in carbon column (57.2%) and with the use of membranes from 0.22 microns recovering the retentate fraction (45.5%) (Pool 1). The reproducibility of the processes was evaluated in 3 pools of colostrum and it was found that the retentate of 0.22  $\mu\text{m}$  was the only one that showed no significant difference compared to dialysate colostrum whey, and this treatment was therefore selected for the preparation of the product. All treatments showed the presence of bands of 25 and 50 kDa, confirming the recovery of the IgG molecule. In chapter 4, pasteurization and lyophilization tests did not indicate a reduction in the levels of IgGs. However, when the lyoprotectants were tested there was a higher stability of IgG when exopolysaccharide (EPS) solution 1% (w/v) was used. The final product had a high composition of bovine IgG (78%), comprising 77% of total proteins. Stability tests confirmed the maintenance of the concentration of IgG in 30 days storage at 20-25°C. It was concluded, therefore, that the processing and use of bovine colostrum in new formulations have relevant applications of interest to the industry. The product developed requires a lower daily dose (less than 5 grams) recommended for products already available on the market and could be directed to different segments such as in the nutrition of immunocompromised patients, the improvement of athletic performance and as supplement in infant foods.

**Keywords:** bovine colostrum, LH-PCR, immunoglobulin G, whey protein, immune system, radial immunodiffusion.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS RAÇAS DE GADO LEITEIRO SEGUNDO REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ – (OUT/2007).....	25
FIGURA 2 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL DENSIDADE (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL DENSIDADE (b).....	31
FIGURA 3 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL DENSIDADE.....	31
FIGURA 4 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL EXTRATO SECO (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL EXTRATO SECO (b).....	32
FIGURA 5 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL EXTRATO SECO....	32
FIGURA 6 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL CINZAS (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL CINZAS (b).....	33
FIGURA 7 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL CINZAS.....	34
FIGURA 8 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL PROTEÍNAS (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL PROTEÍNAS (b).....	34
FIGURA 9 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL PROTEÍNAS.....	35
FIGURA 10 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL GORDURA (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL GORDURA (b).....	36
FIGURA 11 – TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL GORDURA.....	36
FIGURA 12 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL LACTOSE (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL LACTOSE (b).....	37
FIGURA 13 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL LACTOSE.....	38
FIGURA 14 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL ACIDEZ (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL ACIDEZ (b).....	38
FIGURA 15 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL ACIDEZ.....	39
FIGURA 16 – ELETROFEROGRAMA DO LH-PCR AMOSTRA 425 TEMPO 36H.....	53
FIGURA 17 – ELETROFEROGRAMA DO LH-PCR AMOSTRA 539 EM DIFERENTES TEMPOS.....	54
FIGURA 18 - ESTRUTURA DA IMUNOGLOBULINA G.....	60
FIGURA 19 – CURVA PADRÃO KIT VMRD.....	67
FIGURA 20 - FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DO COLOSTRO BOVINO.....	68
FIGURA 21 – TRATAMENTOS DO SORO DE COLOSTRO.....	69
FIGURA 22 – SISTEMA DE MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO QUIXSTAND BENCHTOP.....	69



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 23 – FLUXOGRAMA DAS FRAÇÕES RECUPERADAS DO SISTEMA DE MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO.....	70
FIGURA 24 – FILTRAÇÃO DO SORO EM COLUNA DE CARVÃO 141S 6X12.....	71
FIGURA 25 – PRECIPITAÇÃO DO SORO COM SULFATO DE AMÔNIO.....	72
FIGURA 26 – SISTEMA DE GEL FILTRAÇÃO COM SEPHACRYL 100 HR.....	74
FIGURA 27 – CURVA PADRÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL.....	74
FIGURA 28 – LEITURA DA ABSORBÂNCIA DAS AMOSTRAS DE SORO DE COLOSTRO PASSADAS EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO.....	77
FIGURA 29 – BALANÇO DE MASSA DO RENDIMENTO DA IGG ( <i>POOL 1</i> ).....	82
FIGURA 30 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL IGG – <i>POOL 1</i> .....	85
FIGURA 31 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL IGG – <i>POOL 1</i> .....	85
FIGURA 32 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL IGG – <i>POOL 2</i> .....	86
FIGURA 33 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL IGG – <i>POOL 2</i> .....	86
FIGURA 34 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL IGG – <i>POOL 3</i> .....	87
FIGURA 35 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL IGG – <i>POOL 3</i> .....	87
FIGURA 36 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL – <i>POOL 1</i> .....	88
FIGURA 37 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL – <i>POOL 1</i> .....	88
FIGURA 38 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL – <i>POOL 2</i> .....	89
FIGURA 39 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL – <i>POOL 2</i> .....	89
FIGURA 40 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL – <i>POOL 3</i> .....	90
FIGURA 41 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL – <i>POOL 3</i> .....	90
FIGURA 42 – ELETROFORESE SDS-PAGE DO COLOSTRO TOTAL E FRAÇÕES PURIFICADAS ( <i>POOL 1</i> ).....	91
FIGURA 43 – SORO DE COLOSTRO SEM E COM ADIÇÃO DE PROTETORES APÓS A LIOFILIZAÇÃO.....	109

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 44 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS – TESTE LIOFILIZAÇÃO VARIÁVEL IGG.....	111
FIGURA 45 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, PELA TÉCNICA DE BOX PLOT – TESTE LIOFILIZAÇÃO, VARIÁVEL IGG.....	111
FIGURA 46 – DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS – TESTE LIOFILIZAÇÃO VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL.....	112
FIGURA 47 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS, PELA TÉCNICA DE BOX PLOT – TESTE LIOFILIZAÇÃO, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL.....	112
FIGURA 48 – ELETROFORESE SDS-PAGE TESTE DE ESTABILIDADE ( <i>POOL 1</i> ).....	113
FIGURA 49 – PRODUTO DE COLOSTRO EM PÓ.....	114
FIGURA 50 – ESTABILIDADE DO PRODUTO EM PÓ AO ARMAZENAMENTO.....	116

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO COLOSTRO PARA O LEITE BOVINO.....	21
TABELA 2 – VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO COLOSTRO NA TRANSIÇÃO PARA O LEITE BOVINO.....	22
TABELA 3 – VARIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO NA TRANSIÇÃO DO COLOSTRO PARA O LEITE BOVINO.....	23
TABELA 4 – MÉDIA DA COMPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES EM 35 AMOSTRAS DE LEITE BOVINO.....	24
TABELA 5 – MÉDIA DO CONTEÚDO DE GORDURA DE 5 RAÇAS DE BOVINOS.....	24
TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE COLOSTRO BOVINO.....	28
TABELA 7 – VALORES DE DENSIDADE E ACIDEZ DE AMOSTRAS DE COLOSTRO BOVINO.....	29
TABELA 8 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL DENSIDADE.....	30
TABELA 9 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL EXTRATO SECO.....	32
TABELA 10 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL CINZAS.....	33
TABELA 11 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNAS.....	34
TABELA 12 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL GORDURA.....	35
TABELA 13 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL LACTOSE.....	37
TABELA 14 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL ACIDEZ.....	38
TABELA 15 – PRINCIPAIS FAME ENCONTRADOS EM COLOSTRO BOVINO.....	40
TABELA 16 – MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS USADOS EM FORMULAÇÕES COMERCIAIS.....	46
TABELA 17 – CONTAGEM BACTERIANA EM DIFERENTES CONDIÇÕES E MEIOS DE AMOSTRAS DE COLOSTRO BOVINO.....	51
TABELA 18 – CEPAS ISOLADAS DAS AMOSTRAS DE COLOSTRO.....	52
TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS NO COLOSTRO E LEITE BOVINO.....	60
TABELA 20 – COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES RAÇAS DE BOVINOS.....	61
TABELA 21 – CONCENTRAÇÃO DAS IGG TOTAL EM AMOSTRAS DE COLOSTRO BOVINO.....	76
TABELA 22 – PERDAS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DO COLOSTRO.....	79
TABELA 23 – COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO ENTRE DIFERENTES GRUPOS DE AMOSTRAS.....	84
TABELA 24 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - <i>POOL 1</i> .....	84
TABELA 25 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - <i>POOL 2</i> .....	85
TABELA 26 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - <i>POOL 3</i> .....	86
TABELA 27 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - <i>POOL 1</i> .....	87
TABELA 28 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - <i>POOL 2</i> .....	88
TABELA 29 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - <i>POOL 3</i> .....	89
TABELA 30 – PRODUTOS DE COLOSTRO COMERCIALIZADOS.....	99

## LISTA DE TABELAS

TABELA 31 – EXCIPIENTES USADOS NA LIOFILIZAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS.....	103
TABELA 32 – RESULTADOS DE IGG E PROTEÍNA TOTAL APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO.....	107
TABELA 33 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - TESTE PASTEURIZAÇÃO.....	108
TABELA 34 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - TESTE PASTEURIZAÇÃO .....	108
TABELA 35 – RESULTADOS DE IGG E PROTEÍNA TOTAL APÓS A LIOFILIZAÇÃO.....	110
TABELA 36 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - TESTE LIOFILIZAÇÃO.....	110
TABELA 37 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - TESTE LIOFILIZAÇÃO.....	111
TABELA 38 – COMPOSIÇÃO DO PRODUTO CONTENDO IGG BOVINA.....	114
TABELA 39 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - TESTE DE ESTABILIDADE.....	116

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

A - ampère  
AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*  
ANOVA – análise de variância  
BSA – albumina de soro bovino  
°C – graus Celsius  
CD4 – *Cluster of differentiation molecule 4*  
CD11b – *Cluster of differentiation molecule 11b*  
CLA – *Conjugated Linoleic Acid*  
cm – centímetro  
CMC – carboximetilcelulose  
°D – graus Dornic  
Da – Dalton  
DNTP – *deoxy nucleotide triphosphate*  
dL – decilitro  
DNA - *Deoxyribonucleic Acid*  
D.O. – densidade óptica  
EDTA – *ethylenediamine tetraacetic acid*  
EGF– *Epidermal Growth Factor*  
ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*  
EPS – exopolissacarídeo  
*et al.* – e outros  
FAME – *Fatty Acid Methylated Esters*  
Filt = fração do filtrado  
g – grama  
g/L – grama por litro  
h – hora (s)  
Ig – imunoglobulina  
IgA – imunoglobulina A  
IgG – imunoglobulina G  
IgG1 – imunoglobulina G subclasse 1

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

IgG2 – imunoglobulina G subclasse 2

IgD – imunoglobulina D

IgE – imunoglobulina E

IGF – *Insulin-like Growth Factors*

IgM – imunoglobulina M

kDa - quilodalton

kg – quilograma

L – litro

LAB – *Lactic Acid Bacteria*

Lf – lactoferrina

LH-PCR – *Length Heterogeneity Polymerase Chain Reaction*

Log – logaritmo

Lp - lactoperoxidase

M - molar

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg – miligrama

mg/mL – miligrama por milil

Microf – microfiltração

min – minuto (s)

mL – mililitro

MPCA – meio de cultivo *Milk Plate Count Agar*

MRS CYS – meio de cultivo *Man, Rogosa e Sharpe* com adição de cisteína

n – número de amostras

nm – nanômetro

*overnight* – durante a noite

PBS – *Phosphate buffered saline*

PBV - volume de empacotamento da coluna de gel Sephacryl S100 HR

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PEG – polietilenoglicol

*Pellet* – partículas ou células agrupadas mediante uma etapa de compressão

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

*Pool* – grupo de amostras

psi - *pound force per square inch*

ppm – partes por milhão

p/v – peso por volume

PVP – polivinilpirrolidona

Ret – fração do retentado

RID – *Radial Immunodiffusion*

rpm – rotação por minuto

rRNA – *ribosomal Ribo Nucleic Acid*

s – segundos

SBV - volume de suspensão do gel Sephacryl S100 HR

SDS – *Sodium Dodecyl Sulphate*

sp. – espécie

spp. – espécies

ssp. - subespécie

tDNA – *transfer Deoxyribonucleic Acid*

TIA – *Turbidimetric Immunoassay*

T-RFLP – *Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*

UFC/mL – Unidades Formadoras de Colônias por mililitro

UFPR – Universidade Federal do Paraná

UF – ultrafiltração

V – volts

VMRD – *Veterinary Medical Research & Development*

vs – *versus* (contra)

v/v – volume por volume

$\alpha$ -La – alfa-lactalbumina

$\beta$ -Lg – beta-lactoglobulina

$\mu$ g/mL – micrograma por mililitro

$\mu$ L – microlitro

$\mu$ m – micrômetro

% – por cento

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>19</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>19</b>
<b>CAPITULO 1 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COLOSTRO</b>	
<b>BOVINO.....</b>	<b>20</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>20</b>
1.1. Perfil de ácidos graxos do leite.....	23
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>25</b>
2.1. Coleta e estocagem do colostro.....	25
2.2. Análises físico-químicas.....	26
2.3. Análise estatística.....	27
2.4. Análise de ácidos graxos do colostro bovino.....	27
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>28</b>
3.1. Perfil físico-químico.....	28
3.2. Perfil lipídico.....	40
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>41</b>
<b>Referências.....</b>	<b>41</b>
<b>CAPÍTULO 2 - ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DE</b>	
<b>COLOSTRO BOVINO USANDO MÉTODOS MOLECULARES.....</b>	<b>45</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>45</b>
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>48</b>
2.1. Amostragem.....	48
2.2. Recuperação bacteriana.....	48
2.3. Identificação bacteriana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA.....	49
2.4. Extração do DNA total de colostro bovino.....	50
2.5. LH-PCR do DNA extraído do colostro.....	51
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>51</b>
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>55</b>
<b>Referências.....</b>	<b>55</b>
<b>CAPÍTULO 3 - ESTUDO DE TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO DAS</b>	
<b>IMUNOGLOBULINAS G DE COLOSTRO BOVINO.....</b>	<b>58</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>58</b>
1.1. Colostro bovino como fonte da imunoglobulina G.....	58
1.2. Benefícios do consumo da imunoglobulina G.....	62
1.3. Técnicas de quantificação da imunoglobulina G.....	64
1.4. Métodos para a purificação da imunoglobulina G.....	65
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>66</b>
2.1. Coleta e estocagem do colostro.....	66
2.2. Quantificação das imunoglobulinas G.....	67



## SUMÁRIO

2.3. Produção do soro de colostro.....	67
2.4. Tratamentos do soro de colostro.....	68
2.4.1. Microfiltração e ultrafiltração.....	69
2.4.2. Filtração em coluna de carvão ativado.....	70
2.4.3. Precipitação do soro com sulfato de amônio.....	71
2.4.4. Gel filtração.....	72
2.5. Determinação da proteína total.....	74
2.6. Análise estatística.....	75
2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	75
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>75</b>
3.1. Quantificação das IgGs.....	75
3.2. Análise das frações da gel filtração.....	77
3.3. Análise dos processos de purificação.....	78
3.3.1. Grau de purificação dos diferentes tratamentos.....	90
<b>4. Conclusões.....</b>	<b>92</b>
<b>Referências.....</b>	<b>92</b>
<b>CAPÍTULO 4 – ESTABILIZAÇÃO E FORMULAÇÃO A BASE DE IMUNOGLOBULINA G DE COLOSTRO BOVINO.....</b>	<b>97</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>97</b>
1.1. Produtos a base de imunoglobulina G de colostro bovino.....	98
1.2. Estudos de estabilidade da IgG.....	101
1.3. Uso de exopolissacarídeos como lioprotetores.....	102
<b>2. Material e Métodos.....</b>	<b>104</b>
2.1. Coleta e estocagem do colostro.....	104
2.2. Produção do soro de colostro.....	104
2.3. Tratamento do soro de colostro .....	104
2.4. Teste de estabilidade a pasteurização.....	104
2.5. Teste de estabilidade a liofilização .....	105
2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	105
2.7. Elaboração do produto.....	105
2.8. Estabilidade ao armazenamento.....	106
2.9. Quantificação das imunoglobulinas G.....	106
2.10. Determinação da proteína total.....	106
2.11. Determinação do açúcares total.....	106
2.12. Análise estatística.....	107
<b>3. Resultados e Discussão.....</b>	<b>107</b>
3.1. Estabilidade a pasteurização.....	107
3.2. Estabilidade a liofilização.....	109
3.3. Elaboração do produto contendo IgG.....	114

## SUMÁRIO

3.4. Estabilidade da IgG ao armazenamento.....	115
3.5. Dose recomendada.....	116
<b>4. Conclusões .....</b>	<b>118</b>
<b>Referências.....</b>	<b>118</b>
<b>CONCLUSÕES GERAIS.....</b>	<b>123</b>

## INTRODUÇÃO

O setor produtivo do leite no Brasil é uma das maiores e mais importantes cadeias alimentares do mundo que se encontra em plena expansão, com uma produção de 22,3 bilhões de litros em 2012. O leite no estado *in natura* e em pó representou um faturamento superior a 55 bilhões de dólares em 2012 (IBGE, 2013). Dentre os países com maior produção de leite - União Européia, Estados Unidos, Índia, China e Rússia – encontra-se o Brasil ocupando o sexto lugar a nível mundial (USDA, 2012). Entre os estados brasileiros, o Paraná foi o terceiro maior produtor com uma produção de aproximadamente 680 milhões de litros no ano de 2012 (IBGE, 2013).

O colostro bovino faz parte da cadeia produtiva do leite e consiste de uma secreção glandular produzida pelas fêmeas antes do parto e durante os primeiros dias de lactação após o nascimento do bezerro. Além de nutrir, o colostro apresenta também a função biológica de disponibilizar para o recém-nascido uma adequada proteção imunológica passiva contra infecções microbianas até que o seu sistema imune esteja completamente desenvolvido.

O colostro possui maior concentração de nutrientes quando comparado ao leite, bem como outros componentes, os quais resultam no seu alto valor biológico. Entre eles pode-se destacar o conteúdo em imunoglobulinas (A, G e M), leucócitos, fatores de crescimento (*Insulin-like growth factors* – IGF, *Transforming growth factor* – TGF, *Epidermal growth factor* – EGF), hormônios (*Growth hormone*), citocinas e fatores antimicrobianos (lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima) (FOLEY; OTTERBY, 1978; PAKKANEN; AALTO, 1997).

Atualmente, existe nas propriedades rurais um excedente de colostro produzido pelos bovinos em lactação. Apesar de serem estabelecidas quantidades limites de ingestão de colostro pelos bezerros, a fim de maximizar o nível de IgG absorvida e evitar a *falha na transferência da imunidade passiva*, geralmente o consumo de colostro pelos bezerros é de 2 litros por período de alimentação (STOTT; LUCAS, 1989). Bovinos da raça Holandesa, por exemplo, podem produzir 15 kg ou mais de colostro (SANTOS *et al.*, 2002). Esse fato faz com que seja gerada uma grande oferta de colostro, a qual poderia ser utilizada na elaboração de outros produtos considerando o seu alto valor biológico.

As imunoglobulinas derivadas do leite e do colostro já vêm sendo utilizadas em suplementos infantis e outros alimentos (MEHRA; MARNILA; KORHONEN, 2006). Os

produtos disponíveis no mercado são a base de colostro proveniente de bovinos vacinados ou não vacinados. Estes encontram-se na forma de pós liofilizados ou secos em atomizadores, e soro de colostro líquido filtrado ou concentrado. Dentre os produtos secos incluem-se o pó de colostro, pó desnatado, concentrado de proteína de colostro desnatado e concentrado de soro de colostro. Exemplos de produtos de colostro conhecidos a nível mundial são: Intact<sup>Ti2hM</sup> (Numico RA, Austrália), Gastrogard<sup>®</sup> (Northfield Laboratories, Austrália), Pro-immune 99 (GalaGen Inc., Estados Unidos), Lactimmunoglobulin Biotest (Biotest Pharm GmbH, Alemanha) e Colostrum Gold<sup>TM</sup> (Kirkman<sup>®</sup>, Estados Unidos), MT. Capra Wholefood Nutritionals (Estados Unidos), Caprilac & Information Age Ltd. (Austrália).

Algumas das funções conferidas pelo uso destas formulações são a ação imunopotencializadora, suplemento para aumentar a performance atlética ou prevenção da diarreia viral em pacientes infantis e imunodeprimidos. As invenções registradas por meio de patentes baseiam-se em formulações desidratadas (encapsuladas ou não) de colostro, que se administradas periodicamente providenciam funções fisiológicas específicas. Essas formulações são direcionadas a públicos-alvo específicos, que procuram uma melhora das funções metabólicas por meio da suplementação da dieta.

Pesquisas demonstram que o colostro bovino pode ser administrado em humanos e outros mamíferos já que existe uma compatibilidade dos componentes bioativos com outras espécies (ELFSTRAND *et al.*, 2009). O consumo do colostro bovino tem sido recomendado no alívio de sintomas em pacientes com diarreia, que sofrem de síndrome da imunodeficiência adquirida, colite inflamatória induzida por medicamentos e respostas de fase aguda a cirurgias. Além disso, diversos estudos publicados têm demonstrado que proteínas do soro bovino podem ter ação imunomoduladora, antimicrobiana, antiviral, anticâncer e antiúlcera (HE *et al.*, 2001; PAN *et al.*, 2006; WAN *et al.*, 2010; PLAYFORD *et al.*, 1999).

Ensaio com animais e humanos têm sido realizados a fim de avaliar a eficácia das preparações imunológicas a base de colostro. Foi demonstrado que a incidência de infecções respiratórias pode ser reduzida com a administração oral Intact<sup>TM</sup>, e que o efeito é atribuído a fatores de crescimento endógenos presentes no colostro (BRINKWORTH; BUCKLEY, 2003). Tratamentos utilizando Igs de colostro específicas reduziram o grau de inflamação e a colonização da bactéria *Helicobacter* em ratos (MAMILA *et al.*, 2003) e o grau de inflamação em crianças (OONA *et al.*, 1997).

Considerando a importância desses compostos bioativos e o potencial produtivo do colostro nas fazendas de gado leiteiro, o presente projeto teve como meta estudar um processo eficaz e econômico para a concentração e/ou purificação das imunoglobulinas G, bem como

sua estabilização em uma matrix alimentícia. O processamento dessa matéria-prima pode ser uma alternativa para agregar valor a cadeia produtiva do leite e processos de concentração e purificação dos componentes bioativos do colostro podem resultar na produção de moléculas mais estáveis com manutenção das suas atividades imunológicas e antimicrobianas.

## **Objetivo Geral**

O projeto objetivou utilizar o excedente de colostro bovino, produzido na região metropolitana de Curitiba, no desenvolvimento de produtos de maior valor agregado, destinados ao consumo humano e animal. Com esta finalidade, foram estudadas as características físico-químicas do colostro, bem como, processos para a purificação das imunoglobulinas G e aplicação em um produto. Também foi avaliada a presença de microrganismos potencialmente probióticos no colostro bovino.

## **Objetivos Específicos**

- 1) Coletar colostro de bovinos da raça Holandesa, provenientes da bacia leiteira da região metropolitana de Curitiba.
- 2) Analisar as características físico-químicas (proteínas totais, gorduras totais, lactose, extrato seco e densidade) de amostras de colostro de diferentes bovinos, sendo estas de primeira, segunda e terceira ordenha.
- 3) Analisar a microbiota do colostro bovino por diferentes métodos moleculares.
- 4) Estudar a aplicação de diferentes métodos na purificação das imunoglobulinas G de colostro bovino avaliando o rendimento de cada processo.
- 5) Avaliar a influência da pasteurização no rendimento das imunoglobulinas G de colostro bovino.
- 6) Verificar a influência da etapa de desidratação por liofilização no rendimento das imunoglobulinas G de colostro bovino.
- 7) Testar 2 substâncias suportes (lioprotetores) na etapa de desidratação das imunoglobulinas G de colostro bovino.
- 8) Definir a formulação de um produto em pó avaliando a sua vida de prateleira (estabilidade) em relação ao teor de Imunoglobulinas G.

## CAPITULO 1

### CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DO COLOSTRO BOVINO

#### 1. Introdução

O colostro é uma secreção amarelada produzida pelas glândulas mamárias antes e depois do parto. Este líquido possui viscosidade maior que o leite e é constituído por secreções lácteas e componentes do soro sanguíneo, como as imunoglobulinas e outras proteínas do soro (como por exemplo, albumina,  $\alpha$ -lactalbumina,  $\beta$ -lactoglobulina). Além de conter muitos nutrientes essenciais em concentrações superiores àquelas geralmente encontradas no leite, constitui-se de uma rica fonte de vitamina A com concentrações relativamente altas de caseínas e albuminas. Substâncias bioativas presentes no colostro bovino são as imunoglobulinas, leucócitos, fatores de crescimento, hormônios, citocinas e fatores antimicrobianos não específicos. O início da produção do colostro ocorre no último trimestre da gestação sob a influência de hormônios lactogênicos, como a prolactina (FOLEY; OTTERBY, 1978) e é interrompida 5 a 7 dias após o parto.

O colostro é a primeira fonte de imunoglobulina (Ig) materna. A transferência passiva e absorção das Igs no intestino delgado ocorrem durante as primeiras 24 h após o nascimento dos bezerros, protegendo-os contra organismos causadores de doenças letais para os recém-nascidos (GODDEN, 2008). Outros compostos antimicrobianos importantes para a proteção da flora bacteriana incluem a lisozima, lactoferrina e lactoperoxidase (CUNNINGHAM, 2004). A elevada concentração de proteínas do soro do colostro é interessante, visto que, as imunoglobulinas transferem imunidade passiva ao bezerro, enquanto as demais proteínas, em conjunto, promovem o desenvolvimento e maturação dos tecidos epiteliais do sistema gastrointestinal (SGARBIERI, 2004).

A fim de evitar a falha na transferência da imunidade passiva dos bezerros são recomendadas algumas práticas que definem o tempo e quantidade de colostro a ser ingerido. Para raças de grande porte como a Holandesa e Pardo-Suíça é recomendada a ingestão de pelo menos 10 kg de colostro nas primeiras 12 h após o parto. Já para raças de menor porte como a Jersey, é recomendado um consumo de 7-8 litros de colostro (SANTOS *et al.*, 2002). Considerando que os bovinos produzem 15 ou mais litros de colostro por dia, e que uma parcela é consumida pelos bezerros, nota-se que ainda é gerado um volume excedente de colostro. O aproveitamento e processamento dessa matéria-prima é de grande interesse para a

indústria leiteira e já vem sendo aplicado em outros segmentos de mercado já que possui uma rica composição.

O colostro é constituído basicamente por nutrientes e importantes substâncias como as imunoglobulinas (Tabela 1), leucócitos, fatores de crescimento (IGF, TGF e EGF), hormônios, citocinas e fatores antimicrobianos não específicos (FOLEY; OTTERBY, 1978). Os nutrientes são essenciais para a alimentação do bezerro e encontram-se no colostro em concentrações superiores às encontradas no leite.

TABELA 1 – VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO COLOSTRO PARA O LEITE BOVINO

Parâmetro	Colostro	Transição do leite pós parto		Leite
Número de ordenha pós-parto	1	2	3	6
Gravidade específica	1,056	1,040	1,035	1,032
Sólidos totais (%)	23,9	17,9	14,1	12,9
Lipídios (%)	6,7	5,4	3,9	4,0
Proteína total (%)	14,0	8,4	5,1	3,1
Caseína (%)	4,8	4,3	3,8	2,5
Albumina (%)	6,0	4,2	2,4	0,5
Imunoglobulinas (%)	6,0	4,2	2,4	0,09
IgG (g/100 mL)	3,2	2,5	1,5	0,06
Lactose (%)	2,7	3,9	4,4	5,0
IGF-1 (µg/L)	341	242	144	15
Insulina (µg/L)	65,9	34,8	15,8	1,1
Cinzas (%)	1,11	0,95	0,87	0,74
Cálcio (%)	0,26	0,15	0,15	0,13
Magnésio (%)	0,04	0,01	0,01	0,01
Zinco (mg/100 mL)	1,22	-	0,62	0,3
Manganês (mg/100 mL)	0,02	-	0,01	0,004
Ferro (mg/ 100g)	0,20	-	-	0,05
Cobalto (µg/100g)	0,50	-	-	0,10
Vitamina A (µg/100 mL)	295	190	113	34
Vitamina E (µg/g de lipídio)	84	76	56	15
Riboflavina (µg/mL)	4,83	2,71	1,85	1,47
Vitamina B <sub>12</sub> (µg/100 mL)	4,9	-	2,5	0,6
Ácido fólico (µg/100 mL)	0,8	-	0,2	0,2

FONTE: Autores citados em Foley e Otterby (1978).

O colostro é rico em vitamina A e possui concentrações relativamente altas de caseínas e albuminas (Tabelas 1 e 2). Já o conteúdo de lactose encontrada no colostro é menor que o do leite, já que a produção deste componente é significativamente inibida antes do parto

pela progesterona (CUNNINGHAM, 2004). As maiores concentrações dos componentes ocorrem nas primeiras secreções de colostro (primeiras ordenhas), e vão diminuindo ao longo das próximas ordenhas, apresentando baixas concentrações no leite comercializado.

Na transição do colostro para o leite observa-se uma diminuição no conteúdo de gordura, proteína total, proteínas do soro e minerais, e um aumento das caseínas e da lactose (Tabela 2). Já a concentração das proteínas do soro como a imunoglobulina G (IgG), imunoglobulina A (IgA),  $\alpha$ -lactalbumina ( $\alpha$ -La),  $\beta$ -lactoglobulina ( $\beta$ -Lg), albumina de soro bovino (BSA), lactoferrina (Lf) e lactoperoxidase (Lp) diminui significativamente (Tabela 3) (HENG, 1999).

TABELA 2 – VARIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DO COLOSTRO NA TRANSIÇÃO PARA O LEITE BOVINO

Componentes (%)	Colostro bovino (tempo pós-parto)		Leite bovino
	3 h	72 h	
Gordura	6,80	3,72	3,50
Proteína total	9,42	4,68	3,20
Proteínas do soro	8,50	1,60	0,50
Caseínas	0,92	3,18	2,73
Lactose	2,38	4,27	4,60
Cinzas	1,02	0,74	0,70
Sólidos totais	19,62	13,41	12,00

FONTE: HENG (1999).

O sistema antimicrobiano das secreções lácteas bovinas é formado pelas imunoglobulinas (Igs), lactoferrina, lactoperoxidase e lisozima. As Igs são anticorpos sintetizados pela glândula mamária em resposta a estímulos imunogênicos ou antigênicos, como por exemplo, bactérias e vírus. O colostro bovino é uma fonte de Igs, as quais conferem imunidade passiva ao recém-nascido, auxiliando no desenvolvimento do seu sistema imune (LILIUS; MARNILA, 2001).

A lactoperoxidase faz parte do sistema de defesa contra microrganismos Gram-positivos e Gram-negativos, sendo também capaz de inativar a toxina liberada pela difteria (ZAPICO *et al.*, 1995). A lactoperoxidase tem atividade bactericida porque oxida tiocianatos na presença de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (NABET; LINDEN, 2001).

A lactoferrina é uma glicoproteína monomérica, que possui um peso molecular de 80 kDa e tem a propriedade de se ligar ao ferro (LONNERDAL; IYER, 1995). Ela está presente no leite bovino em concentrações entre 0,02 e 0,35 mg/mL de lactoferrina (MADUREIRA *et al.*, 2007). Dentre os efeitos benéficos da lactoferrina e do seu peptídeo lactoferricina, estão a inibição da proliferação e crescimento das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pela



queação (seqüestro) do ferro disponível no ambiente (NABET; LINDEN, 2001). Os peptídios liberados pela hidrólise enzimática da lactoferrina possuem ação inibitória contra o vírus da hepatite C e a bactéria *Helicobacter pylori* (IKEDA *et al.* 1998; MCCANN, LEE, WAN, 2001). A lactoferricina, peptídio resultante da ação da pepsina sobre a lactoferrina, apresenta ação antimicrobiana (BELLAMY *et al.*, 1992) e apoptótica sobre as células da leucemia humana (ROY *et al.*, 2002).

Já a lisozima é uma enzima antimicrobiana que pode estar presente no colostro, leite humano e ovo. Sua concentração varia entre 0,14 a 0,70 mg/L no colostro e 0,07 a 0,60 no leite (KORHONEN, 1977). Possui peso molecular de 15 kDa. Essa enzima hidrolisa a ligação  $\beta$  1 $\rightarrow$ 4 entre o ácido N-acetil murâmico e os resíduos 2-acetil-amino-2-deóxi-D- glicose nas paredes celulares das bactérias, ocasionando a lise celular. A lisozima é tóxica para bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Listeria monocytogenes*(SÉVERIN; WENSHUI, 2005). O efeito sinérgico da lisozima junto a lactoferrina demonstrou ser mais efetivo contra *E. coli* e *Micrococcus luteus* (YAMAUCHI, 1992; YAMAUCHI *et al.*, 1993).

TABELA 3 – VARIAÇÃO DAS PROTEÍNAS DO SORO NA TRANSIÇÃO DO COLOSTRO PARA O LEITE BOVINO (mg/mL)

Tempo pós-parto (h)	IgG	IgA	$\alpha$ -La	$\beta$ -Lg	BSA	Lf	Lp
3	45,00	7,08	5,97	40,50	5,07	3,06	3,46
12	61,50	9,55	8,40	39,88	5,21	4,28	4,29
24	40,00	6,98	8,56	26,54	1,97	1,77	2,45
36	5,00	3,17	6,42	18,47	1,20	n.d.	1,00
48	3,60	0,56	8,12	19,42	1,15	0,94	n.d.
60	5,80	0,56	8,12	19,42	1,15	0,94	n.d.
72	6,00	0,12	2,36	6,18	0,44	n.d.	n.d.
Leite	0,50	0,09	2,00	4,00	0,28	0,02-0,35	0,03

FONTE: HENG (1999).

NOTA: n.d. = não detectado; IgG = imunoglobulina; IgA = imunoglobulina A,  $\alpha$ -La =  $\alpha$ -lactalbumina;  $\beta$ -Lg =  $\beta$ -lactoglobulina; BSA = albumina de soro bovino; Lf = lactoferrina; e Lp = lactoperoxidase.

### 1.1. Perfil de ácidos graxos do leite

O leite e derivados fornecem de 15 a 25% da gordura consumida pelos humanos, o que representa o fornecimento de uma parcela de 25 a 35% da gordura saturada (CHILLIARD *et al.*, 2001).

Os ácidos graxos sintetizados no leite são derivados basicamente de 2 fontes: alimentação e atividade microbiana no rumen da vaca (PARODI, 2004). Dessa forma, a

gordura do leite é composta por 98% de triglicerídeos, sendo os 2% restantes, representados por ácidos graxos livres, mono e diglicerídeos, fosfolípidos, esteróis e hidrocarbonetos (JENNESS; WONG; MARTH, 1988).

Apesar de 406 ácidos graxos já terem sido listados (DEBRY, 2001), apenas 16 representam a maioria dos ácidos graxos presentes no leite (COLLOMB; BÜHLER, 2000) (Tabela 4). Dentre os ácidos graxos presentes no leite 70% são saturados, 25% são monoinsaturados e 5% são poli-insaturados (GRUMMER, 1991).

TABELA 4 –MÉDIA DA COMPOSIÇÃO DOS PRINCIPAIS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES EM 35 AMOSTRAS DE LEITE BOVINO

Ácido graxo	Média (g de ácido graxo / 100g de gordura)
C4:0 butírico	3,23
C6:0 capríico	2,02
C8:0 caprílico	1,19
C10:0 cáprico	2,66
C10:1 caproléico	0,29
C12:0 láurico	2,84
C14:0 mirístico	9,51
C14:1 cis miristoléico	0,83
C15:0 pentadecanóico	1,00
<b>C16:0 palmítico</b>	<b>23,90</b>
C16:1 9 cis palmitoléico	1,25
C18:0 esteárico	8,98
<b>C18:1 9 cis oléico</b>	<b>17,36</b>
C18:2 9 cis, 12 cis linoléico	1,21
C18:2 9 cis, 11 trans ácido linoléico conjugado	1,44
C18:3 9 cis, 12 cis, 15 cis linolênico	0,86

FONTE: COLLOMB e BÜHLER (2000).

Em relação a gordura total presente no leite, podem ser observadas algumas variações entre as diferentes raças de bovinos (Tabela 5).

TABELA 5 –MÉDIA DO CONTEÚDO DE GORDURA DO LEITE DE 5 RAÇAS DE BOVINOS

Raça	Média de gordura (%)
Ayrshire	3,99 ± 0,33
Pardo-Suíço	4,16 ± 0,35
Guernsey	4,87 ± 0,45
Holandesa	3,70 ± 0,39
Jersey	5,13 ± 0,54

FONTE: GAUNT (1980).

Apesar de apresentar um menor conteúdo de gordura em relação às outras raças, o rebanho de gado holandês tem uma demanda crescente no mundo todo devido a sua alta capacidade em volume de produção de leite e por longos períodos de lactação. Dessa forma, como o volume de produção é maior a quantidade de componentes produzidos (como gordura e proteína) no montante é superior quando comparada às demais raças.

O rebanho bovino leiteiro do Paraná é constituído majoritariamente por animais mestiços, sendo que metade possui características da raça Holandesa. Entre os grandes produtores essa raça pode representar até 2/3 do rebanho. No entanto a predominância da raça Holandesa varia dependendo da região (Figura 1) (IPARDES; EMATER, 2009).

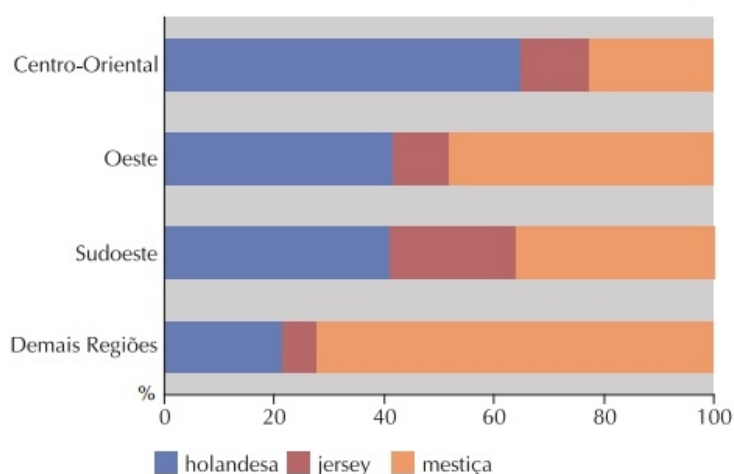


FIGURA 1 – DISTRIBUIÇÃO DAS RAÇAS DE GADO LEITEIRO SEGUNDO REGIÕES DO ESTADO DO PARANÁ – (OUT/2007)

O objeto desse estudo foi colostro bovino proveniente de gado da raça Holandesa, o qual foi selecionado considerando o alto volume de produção de leite e a importância econômica da raça Holandesa no estado do Paraná.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Coleta e estocagem do colostro

As amostras de colostro bovino foram coletadas na Fazenda Santa Cecília – Piraquara-PR. O colostro foi proveniente de vacas da raça Holandesa de 2 a 8 anos, que produziam em média 40 L de leite por dia e que não estavam em tratamento com antibióticos.

Após a assepsia dos tetos com solução de iodo, coletou-se o colostro por ordenha mecânica em frascos limpos e desinfetados. As ordenhas foram realizadas logo após o parto (primeira ordenha), 12 h após o parto (segunda ordenha) e 24 h após o parto (terceira ordenha). Após a coleta, as amostras foram imediatamente congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A fim de minimizar as alterações nos componentes do colostro, foram tomados alguns cuidados como o descongelamento parcial das amostras a  $4^{\circ}\text{C}$  por 12 h, seguido pela imersão em banho-maria a  $45-50^{\circ}\text{C}$  até a obtenção total da fase líquida.

A disponibilidade das amostras de colostro variou em função da demanda da fazenda (parte do volume foi utilizado para a amamentação dos bezerros) e outros fatores como uma baixa produção de colostro na segunda e terceira ordenha, e descarte de amostras de colostro com aspecto avermelhado.

## 2.2. Análises físico-químicas

A fim de se estabelecer o perfil físico-químico das amostras de colostro bovino foram realizadas análises de extrato seco, cinzas, proteína, gordura, lactose, densidade e acidez. Todas as determinações seguiram os padrões estabelecidos pela AOAC (1998) para a análise de leite. A identificação das amostras foi feita pela numeração correspondente ao código do bovino. Para a execução das análises diluíram-se as amostras 1:2 e 1:3 (v/v) em água destilada.

O teor de extrato seco total foi determinado pela secagem a  $105^{\circ}\text{C}$  até peso constante. As cinzas foram determinadas pela incineração em mufla a  $550^{\circ}\text{C}$  e pesagem da massa seca. A determinação de proteína foi realizada pelo método Macro-Kjeldahl, e a porcentagem de nitrogênio foi multiplicada pelo fator 6,38. O teor de lipídios foi determinado em Lactobutirômetro de Gerber. A lactose foi analisada pelo método de determinação de glicídios redutores em lactose. A densidade foi determinada por meio de pesagem em picnomêtro, utilizando como valor referência o valor da densidade da água. A acidez foi determinada por titulação em graus Dornic e por método potenciométrico com medição do valor diretamente no pHmetro HANNA INSTRUMENTS modelo HI 9321. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

### 2.3. Análise estatística

Devido a variabilidade das amostras de colostro disponíveis foi utilizada a técnica de Análise de Variância (ANOVA) para dados desbalanceados (MONTGOMERY, 2012), que é uma técnica similar a ANOVA, sendo utilizada quando não há todas as informações referentes a uma amostra observada em todas as repetições. Os resultados foram analisados ao nível de 5% de significância. Utilizou-se o teste de Tukey para comparação de médias.

### 2.4. Análise de ácidos graxos do colostro bovino

Uma amostra de colostro bovino (449 – primeira ordenha) foi descongelada e centrifugada a 4700 rpm por 15 min a 2°C. A fração lipídica, localizada na parte superior, foi removida e analisada segundo a metodologia de Hartmann e Lago (1973). A preparação da amostra consistiu em 4 etapas: saponificação, esterificação, precipitação e extração. Primeiramente pesou-se aproximadamente 50 mg de amostra em um tubo e adicionou-se 4 mL de solução KOH 0,5M em metanol (saponificação). Agitou-se o tubo e deixou-se em água fervente por 5 min. Esfriou-se e adicionou-se 5 mL do reagente de esterificação (2 g de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  + 60 mL de metanol + 3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado). Deixou-se em refluxo por 15 min. Agitou-se o tubo e deixou-se 5 min em água fervente. Esfriou-se e adicionou-se 4 mL da solução saturada de NaCl (precipitação). Adicionou-se 5 mL de heptano e agitou-se vigorosamente (extração). Deixou-se o tubo em repouso para a completa separação de fases. Recuperou-se a fase superior e injetou-se uma alíquota em cromatógrafo gasoso Shimadzu GC 2010 equipado com uma coluna Restek RTX-Wax e um detector de ionização de chama. A temperatura de injeção foi de 250°C. Ácidos graxos foram identificados através da comparação dos tempos de retenção e áreas comparadas ao padrão composto por uma mistura de ésteres metilados de ácidos graxos (Supelco 37 FAME mix).

A taxa de conversão de lipídios em ésteres metilados de ácidos graxos (FAME) foi calculada pela fórmula a seguir:

$$\% \text{ conversão [FAME]} = \frac{[\text{FAME}] \text{ prático}}{[\text{FAME}] \text{ teórico}}, \text{ sendo que:}$$

$$[\text{FAME}] \text{ teórico} = \frac{\text{peso amostra (mg)}}{\text{volume heptano (mL)}}$$

### 3. Resultados e Discussão

A refrigeração e o congelamento do colostro ajudam a reduzir a contaminação microbiana e podem ser realizados dentro de 1 h após a coleta. A refrigeração pode ainda ser feita com o uso ou não de preservantes como o sorbato de potássio. Apesar das IgGs se manterem estáveis por pelo menos 1 semana sob refrigeração, a contagem média de bactérias pode alcançar valores superiores a 100 UFC/mL após 2 dias de refrigeração. Contudo, na adição de sorbato de potássio (0,5%) a contagem de bactérias se manteve inferior a 100 UFC/mL quando o colostro foi mantido refrigerado por 6 dias (STEWART *et al.*, 2005). Colostros podem ser congelados por mais de 1 ano, desde que não ocorram ciclos de congelamento-descongelamento. O descongelamento do colostro deve ser realizado a temperaturas inferiores a 60°C de modo a evitar a desnaturação de imunoglobulinas (MCMARTIN *et al.*, 2006).

#### 3.1. Perfil físico-químico

A composição do colostro bovino pode ser influenciada por fatores como idade, número de parições, estado de saúde do animal, tempo de coleta, variações climáticas entre outros. Analisou-se a composição de colostro de 8 bovinos da raça Holandesa (Tabela 6 e 7), sendo que, as amostras 336 e 527 foram coletadas 0, 12 e 24 h após o parto, as amostras 208, 398 e 175 foram coletadas 0 e 12 h após o parto, e as amostras 505, 399 e 88 foram coletadas 24 h após o parto. A variabilidade das amostras e dos tempos de ordenha ocorreu em função da disponibilidade de colostro, já que parte do volume foi utilizado na prática de alimentação dos bezerros. Dessa forma, não foi possível analisar os 3 tempos de ordenha de todas as amostras.

TABELA 6 – COMPOSIÇÃO DE AMOSTRAS DE COLOSTRO BOVINO (%)

Amostra	Extrato seco	Cinzas	Lactose	Proteínas	Gordura
<b>Leite (referência)</b>	<b>11,72 ± 0,12</b>	<b>0,82 ± 0,01</b>	<b>4,98 ± 0,04</b>	<b>4,50 ± 0,06</b>	<b>3,23 ± 0,23</b>
<b>1ª ordenha (n=5)</b>					
175	14,90 ± 0,39	0,91 ± 0,03	3,90 ± 0,10	6,38 ± 0,37	2,32 ± 0,17
208	29,22 ± 0,64	1,26 ± 0,04	1,92 ± 0,06	15,69 ± 0,10	6,73 ± 0,42
336	27,36 ± 0,17	1,19 ± 0,05	2,50 ± 0,06	12,93 ± 0,45	6,16 ± 0,76

## Continuação

Amostra	Extrato seco	Cinzas	Lactose	Proteínas	Gordura
<b>1ª ordenha (n=5)</b>					
398	25,05 ± 0,18	1,22 ± 0,01	2,73 ± 0,03	11,43 ± 0,78	6,30 ± 0,17
527	25,00 ± 0,05	1,15 ± 0,03	2,25 ± 0,03	11,67 ± 0,39	6,13 ± 0,23
<b>Média</b>	<b>24,31 ± 5,54</b>	<b>1,15 ± 0,14</b>	<b>2,66 ± 0,76</b>	<b>11,62 ± 3,38</b>	<b>5,53 ± 1,81</b>
<b>2ª ordenha (n=5)</b>					
175	11,97 ± 0,12	0,83 ± 0,02	4,31 ± 0,03	4,72 ± 0,07	1,72 ± 0,09
208	20,58 ± 0,16	1,12 ± 0,03	2,63 ± 0,11	12,57 ± 0,19	4,65 ± 1,67
336	18,73 ± 0,24	1,14 ± 0,02	3,05 ± 0,08	8,01 ± 0,08	3,73 ± 0,12
398	15,84 ± 0,04	1,05 ± 0,00	3,38 ± 0,08	7,27 ± 0,24	3,74 ± 0,17
527	26,42 ± 0,11	1,06 ± 0,03	2,93 ± 0,04	9,86 ± 0,20	11,11 ± 0,76
<b>Média</b>	<b>18,71 ± 5,40</b>	<b>1,04 ± 0,12</b>	<b>3,26 ± 0,65</b>	<b>8,49 ± 2,93</b>	<b>5,81 ± 4,03</b>
<b>3ª ordenha (n=5)</b>					
336	16,18 ± 0,20	1,08 ± 0,02	3,48 ± 0,04	7,35 ± 0,13	2,28 ± 0,15
527	18,73 ± 0,07	0,91 ± 0,01	3,70 ± 0,08	7,51 ± 0,18	7,07 ± 0,61
505	13,99 ± 0,12	0,88 ± 0,01	4,38 ± 0,10	6,68 ± 0,34	4,00 ± 0,18
399	15,02 ± 0,39	0,97 ± 0,04	4,21 ± 0,24	7,95 ± 0,14	4,15 ± 0,18
88	16,15 ± 0,15	0,99 ± 0,01	3,60 ± 0,01	6,51 ± 0,06	5,12 ± 0,09
<b>Média</b>	<b>16,01 ± 1,77</b>	<b>0,97 ± 0,08</b>	<b>3,87 ± 0,40</b>	<b>7,20 ± 0,60</b>	<b>4,52 ± 1,75</b>

TABELA 7 – VALORES DE DENSIDADE E ACIDEZ DE AMOSTRAS DE COLOSTRO BOVINO

Amostra	Densidade	Acidez (°D)	pH
<b>Leite (referência)</b>	<b>1,027 ± 0,00</b>	<b>14,2 ± 0,57</b>	<b>6,86</b>
<b>1ª ordenha (n=5)</b>			
175	1,036 ± 0,004	28,4 ± 0,6	6,26
208	1,073 ± 0,004	57,1 ± 1,5	6,12
336	1,063 ± 0,004	50,8 ± 1,1	6,13
398	1,062 ± 0,004	53,1 ± 1,1	6,13
527	1,027 ± 0,004	52,5 ± 1,0	6,22
<b>Média</b>	<b>1,060 ± 0,014</b>	<b>48,4 ± 11,4</b>	<b>6,17</b>
<b>2ª ordenha (n=5)</b>			
175	1,031 ± 0,003	24,1 ± 0,6	6,31
208	1,051 ± 0,003	34,7 ± 1,0	6,26
336	1,046 ± 0,003	43,6 ± 0,0	6,12
398	1,048 ± 0,003	38,0 ± 1,1	6,24

### Continuação

Amostra	Densidade	Acidez (°D)	pH
<b>2ª ordenha (n=5)</b>			
527	1,050 ± 0,004	41,9 ± 0,6	6,20
<b>Média</b>	<b>1,045 ± 0,008</b>	<b>36,4 ± 7,7</b>	<b>6,23</b>
<b>3ª ordenha (n=5)</b>			
336	1,038 ± 0,000	34,3 ± 0,6	6,24
527	1,041 ± 0,003	34,7 ± 0,0	6,16
505	1,035 ± 0,004	25,7 ± 1,0	6,36
399	1,045 ± 0,003	31,7 ± 1,0	6,33
88	1,050 ± 0,003	30,7 ± 1,0	6,35
<b>Média</b>	<b>1,042 ± 0,006</b>	<b>31,4 ± 3,6</b>	<b>6,29</b>

Com relação à variável densidade pode-se notar que houve diferença tanto em relação às 3 ordenhas quanto em relação às amostras do mesmo grupo de ordenha, pois o p-valor para o teste F apresentou-se como significativo ao nível  $\alpha=0,05$  de significância (Tabela 8).

TABELA 8 –TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL DENSIDADE

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p-valor
Ordenha	2	0,0009	0,0005	29,1470	0,001754 *
Amostra	7	0,0011	0,0002	10,3086	0,010320 *
Resíduos	5	0,0001	0,0000		
Total	14	0,0021			

O gráfico (a) na Figura 2 mostrou que houve diferença significativa entre as ordenhas 1-2 e 1-3, a qual é representada no gráfico (b) (Densidade vs Ordenha). Para identificar quais tratamentos (ordenhas) apresentaram diferença foi utilizado o teste de Tukey para comparação de médias.

As diferenças entre as variáveis podem ser justificadas pela composição do colostro, que na primeira ordenha apresenta-se mais concentrado, tendo portanto uma densidade maior em relação a segunda e terceira ordenha. Variações na concentração entre a segunda e terceira ordenha não foram significativas ao nível de 5%.



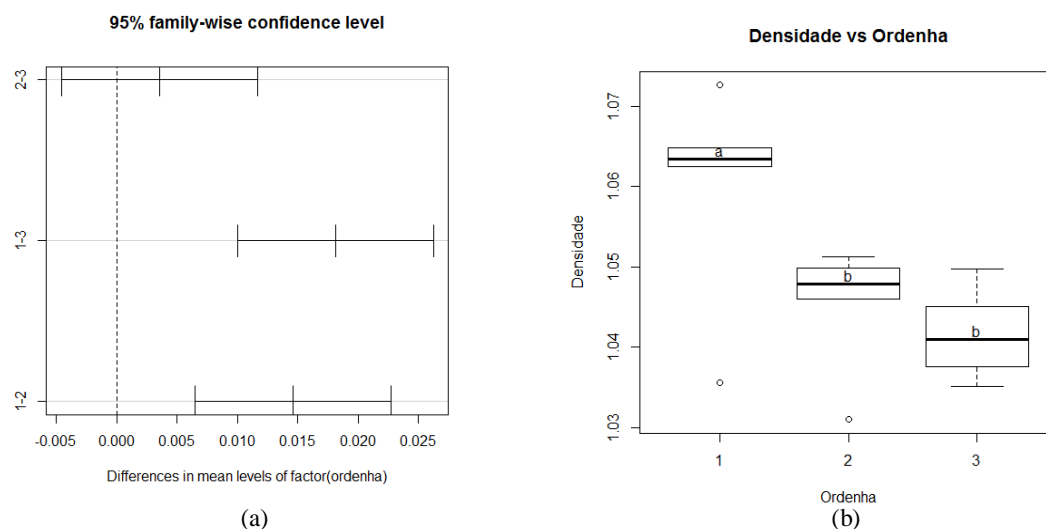


FIGURA 2 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL DENSIDADE (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL DENSIDADE (b)

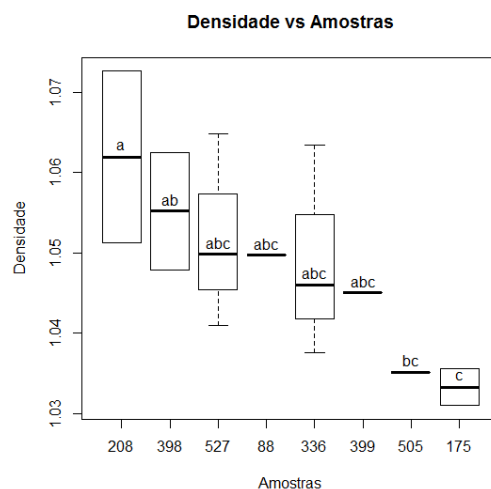


FIGURA 3 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL DENSIDADE

Na Figura 3 observaram-se diferenças em relação às amostras, uma vez que este fator apresentou-se como significativo no teste da ANOVA. Para identificar quais amostras apresentaram diferença foi utilizado o teste de Tukey para comparação de médias, onde foi possível observar que as amostras 208 – 505, 208 – 175 e 398 – 175 foram as que apresentaram diferenças em relação a média. Esse fato pode ser justificado pela ausência das amostras da terceira ordenha (208 e 398) cujos valores poderiam influenciar na análise e tornar as amostras 505 e 175 menos discrepante em relação a elas.

Com relação ao extrato seco notou-se que houve diferença em relação às ordenhas, pois o p-valor para o teste F apresentou-se como significativo ao nível  $\alpha=0,05$  de significância (Tabela 9).

TABELA 9 –TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL EXTRATO SECO

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p-valor
Ordenha	2	142,24	71,12	8,1037	0,02699 *
Amostra	7	208,03	29,72	3,3862	0,09904
Resíduos	5	43,88	8,78		
Total	14	394,16			

A Figura 4 (a) mostra que houve diferença significativa entre as ordenhas 1-3, a qual é representada no gráfico (b) (Extrato vs Ordenha). A diferença no teor de sólidos totais foi evidente entre amostras de primeira e terceira ordenha.

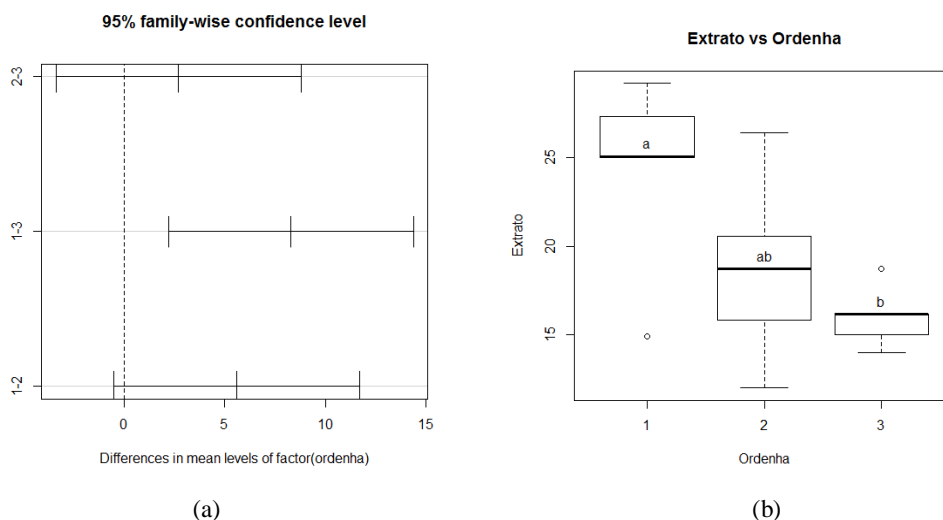


FIGURA 4 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL EXTRATO SECO (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL EXTRATO SECO (b)

Já com relação às amostras, não houve diferença significativa (Figura 5), como apresentado no quadro da ANOVA (Tabela 9).

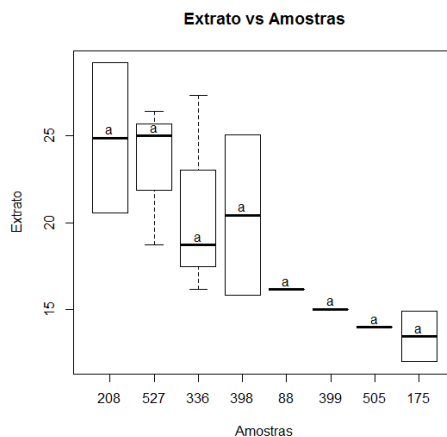


FIGURA 5 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL EXTRATO SECO

Analisando os resultados do teor de cinzas verificaram-se diferenças tanto em relação às ordenhas quanto em relação às amostras, pois o p-valor para o teste F apresentou-se como significativo ao nível  $\alpha=0,05$  de significância (Tabela 10).

TABELA 10 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL CINZAS

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p-valor
Ordenha	2	0,0547	0,0273	15,1044	0,00760 *
Amostra	7	0,1540	0,0220	12,1529	0,00713 *
Resíduos	5	0,0091	0,0018		
Total	14	0,2178			

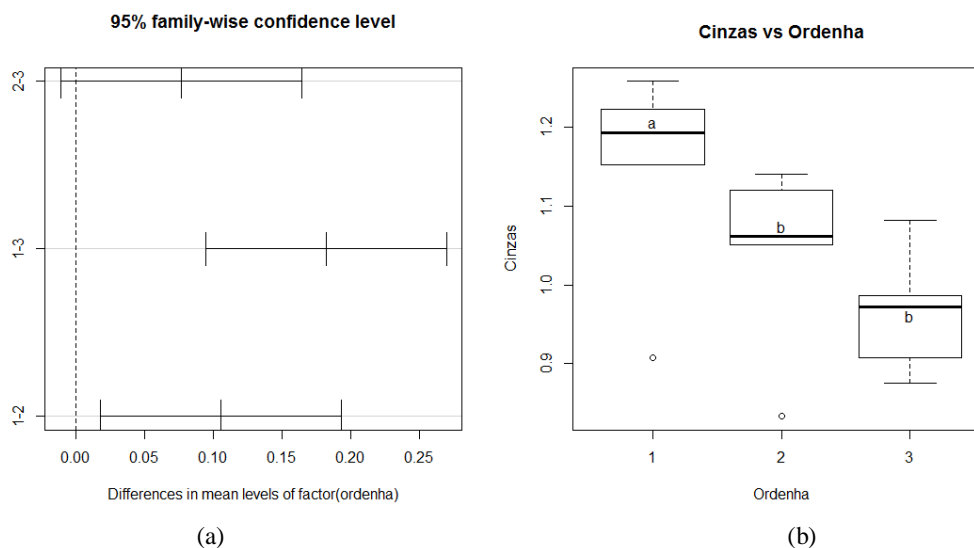


FIGURA 6 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL CINZAS (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL CINZAS (b)

De acordo com os gráficos (a) e (b) na Figura 7, nota-se que houve diferença significativa entre as ordenhas 1-2 e 1-3. Na Figura 6, observa-se que houve diferença em relação às amostras, uma vez que ela apresentou-se como significativa no teste de ANOVA (Tabela 10). No teste de Tukey observou-se que as amostras 208 – 505, 208 – 175, 336 – 505, 336 – 175, 398 – 505 e 398 – 175 apresentaram diferenças em relação a média. A primeira ordenha apresentou diferença em relação a segunda e terceira ordenha.

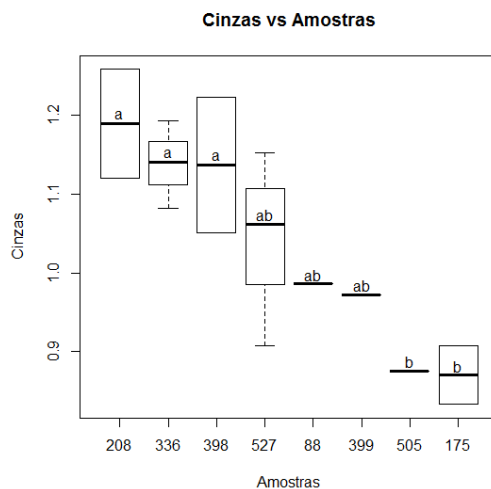
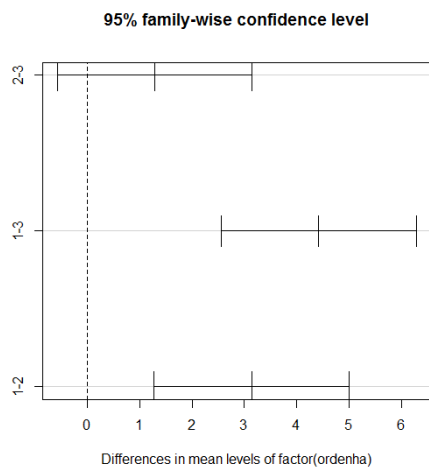


FIGURA 7 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL CINZAS

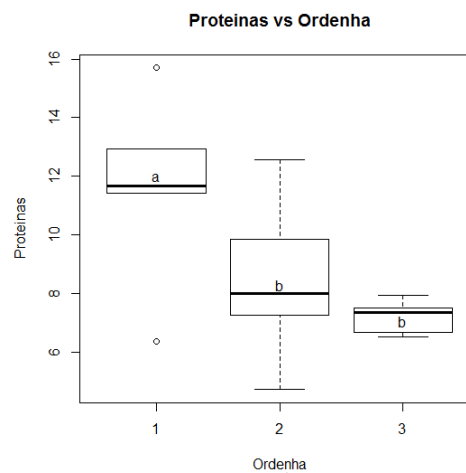
Da mesma forma, para o teor de proteínas foram observadas diferenças tanto em relação às ordenhas quanto em relação às amostras, pois o p-valor para o teste F apresentou-se como significativo ao nível  $\alpha=0,05$  de significância (Tabela 11).

TABELA 11 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNAS

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p-valor
Ordenha	2	38,17	19,09	23,2372	0,00294 *
Amostra	7	77,57	11,08	13,4913	0,00562 *
Resíduos	5	4,11	0,82		
Total	14	119,85			



(a)



(b)

FIGURA 8 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL PROTEÍNAS (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL PROTEÍNAS (b)

Através dos gráficos (a) e (b) na Figura 8 pode-se notar diferenças significativas entre as ordenhas 1-2 e 1-3. Em relação às amostras, uma vez que esta variável apresentou-se como significativa no teste de ANOVA (Tabela 11), foi possível observar que as amostras 208 – 399, 208 – 505, 208 – 88, 208 – 175, apresentaram diferenças em relação a média (Figura 9). As maiores diferenças ocorrem da primeira para a segunda ordenha. Esse fato é relevante, considerando que este fator (proteína) é o de maior importância nessa pesquisa, ou seja, as frações mais importantes encontram-se nas primeiras horas de coleta do colostro.

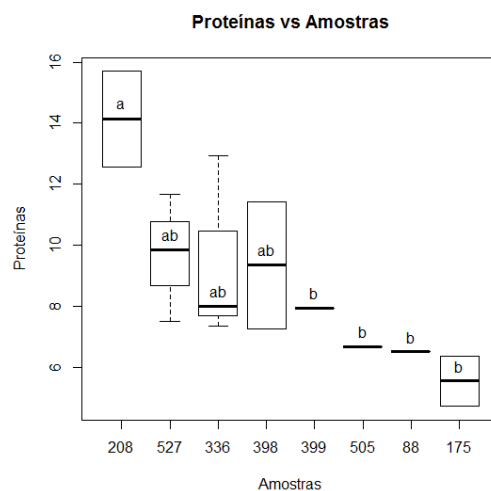


FIGURA 9 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL PROTEÍNAS

Já o fator gordura, quando analisado, não apresentou diferença em relação às ordenhas e nem em relação às amostras, segundo o p-valor para o teste F que não foi significativo ao nível  $\alpha=0,05$  de significância (Tabela 12).

TABELA 12 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL GORDURA

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p-valor
Ordenha	2	6,67	3,34	0,8075	0,49670
Amostra	7	56,09	8,01	1,9396	0,24172
Resíduos	5	20,66	4,13		
Total	14	83,42			

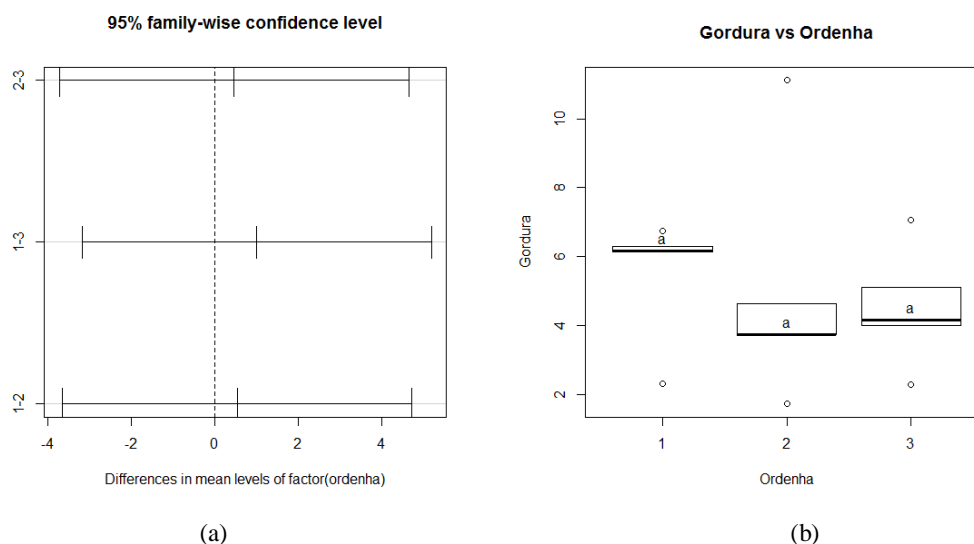


FIGURA 10 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL GORDURA (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL GORDURA (b)

Aplicando-se o teste de Tukey nota-se que não houve diferença significativa entre as ordenhas e em relação às amostras, como apresentado na Figura 10 e 11 (a) e (b). Esse fato pode ser justificado pela heterogeneidade entre as ordenhas e entre as amostras. Não foi encontrada uma relação linear entre o teor de gordura e proteínas.

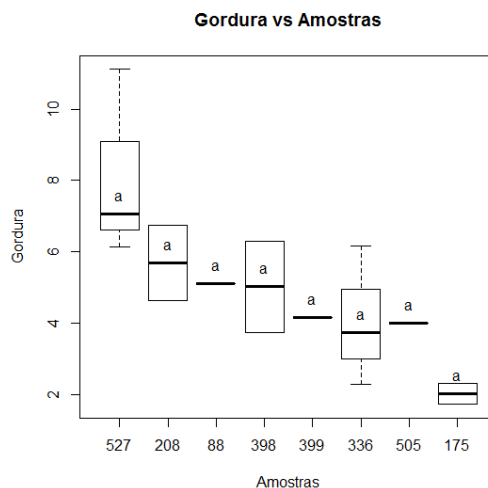


FIGURA 11 – TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL GORDURA

O teor de lactose apresentou diferença tanto em relação às ordenhas quanto em relação às amostras, pois o p-valor para o teste F mostrou-se significativo ao nível  $\alpha=0,05$  de significância (Tabela 13).

TABELA 13 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL LACTOSE

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p-valor
Ordenha	2	2,0057	1,0029	57,7014	0,00035 *
Amostra	7	4,5052	0,6436	37,0311	0,00052 *
Resíduos	5	0,0869	0,0174		
Total	14	6,5978			

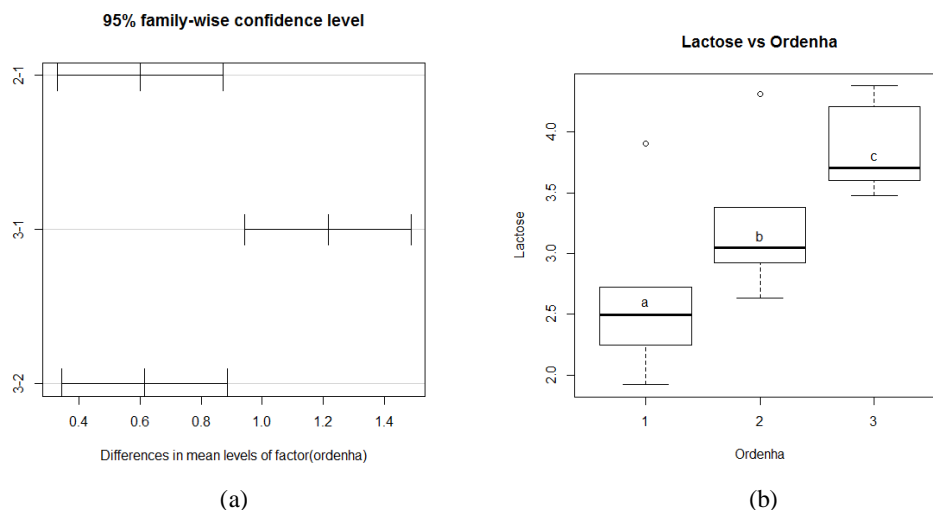


FIGURA 12 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL LACTOSE (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL LACTOSE (b)

Através do gráfico (a) na Figura 12 nota-se que houve diferença significativa entre as ordenhas 1-2, 1-3 e 2-3, a qual é representada no gráfico (b) (Lactose vs Ordenha). Esse fator foi o único que apresentou-se diferente para todas as ordenhas.

A produção da lactose é significativamente inibida antes do parto pela progesterona (CUNNINGHAM, 2004), o que justifica o conteúdo inferior de lactose no colostro em relação ao leite. Logo, as maiores concentrações de lactose ocorrem nas próximas ordenhas após o parto, como verificado nesta pesquisa.

Na Figura 13, pode-se observar a diferença em relação as amostras, uma vez que ela apresentou-se como significativa no teste de ANOVA (Tabela 13). Para identificar quais amostras apresentaram diferença foi utilizado o teste de Tukey para comparação de médias, onde foi possível observar que as amostras 505 – 88, 505 – 398, 505 – 336, 505 – 527, 505 – 208, 399 – 398, 399 – 336, 399 – 527, 399 – 208, 88 – 208, 398 – 208 e 336 – 208, foram as que apresentaram diferenças em relação a média.

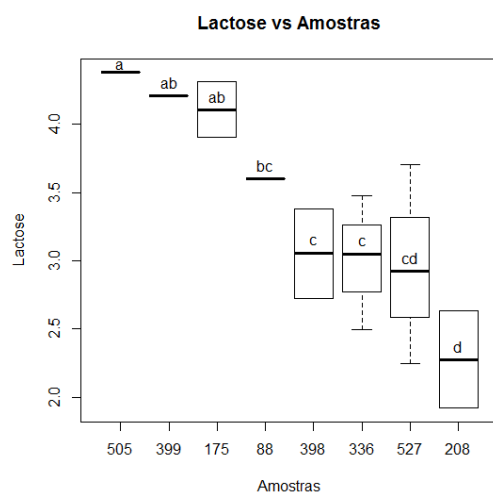


FIGURA 13 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL LACTOSE

TABELA 14 – TESTE ANOVA PARA A VARIÁVEL ACIDEZ

Fator de Variação	Graus de Liberdade	Soma de Quadrados	Quadrado Médio	Valor F	p-valor
Ordenha	2	571,99	286,00	14,0787	0,00883 *
Amostra	7	709,86	101,41	4,9921	0,04773 *
Resíduos	5	101,57	20,31		
Total	14	1383,42			

Observando a variável acidez, notaram-se diferenças tanto em relação às ordenhas quanto em relação às amostras, pois o p-valor para o teste F apresentou-se como significativo ao nível  $\alpha=0,05$  de significância (Tabela 14).

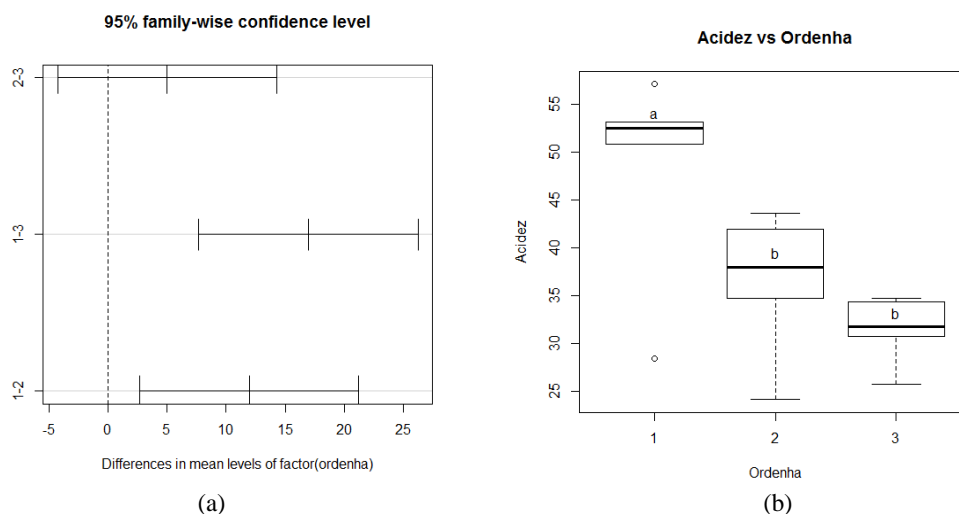


FIGURA 14 – DIFERENÇAS ENTRE OS NÍVEIS FATOR ORDENHA, VARIÁVEL ACIDEZ (a), TESTE DE TUKEY FATOR ORDENHA, VARIÁVEL ACIDEZ (b)



O gráfico (a) na Figura 14 mostra que houve diferença significativa entre as ordenhas 1-2 e 1-3, a qual é representada também pelo gráfico (b) (Acidez vs Ordenha). Comparando-se, a acidez entre as amostras, observou-se uma diferença em relação às amostras, uma vez que ela apresentou-se como significativa no teste de ANOVA (Tabela 14). Apesar da variável amostra mostrar-se significativa para a ANOVA, ao utilizar-se o teste de Tukey para comparação de médias não foi possível identificar quais amostras apresentaram diferença significativa entre si (Figura 15).

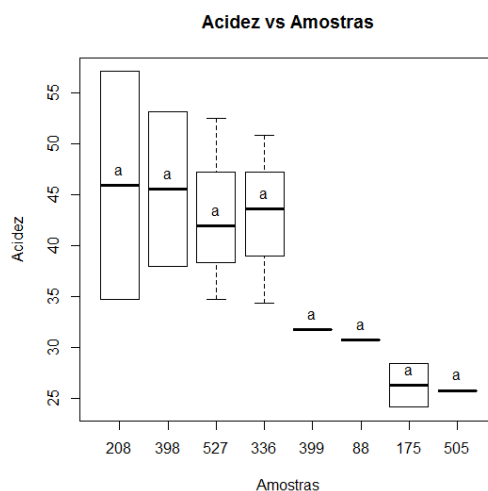


FIGURA 15 –TESTE DE TUKEY FATOR AMOSTRAS, VARIÁVEL ACIDEZ

Nardone *et al.* (1997) relataram uma correlação positiva entre a acidez e o teor de proteínas ( $R^2 = 0,79$ ). O mesmo foi observado para as amostras de primeira ordenha ( $R^2 = 0,85$ ), onde as amostras com maior teor de proteínas apresentaram maior acidez.

Os resultados das análises físico-químicas desta pesquisa foram similares a composição relatada por outros autores. Foley e Otterby (1978) analisaram a composição de colostro bovino de 1 a 6 h após o parto. Os valores encontrados por esses autores até 2 h após o parto para extrato seco, cinzas, lactose, proteínas e lipídios foram similares aos encontrados neste trabalho para colostro de primeira ordenha. O mesmo foi verificado para o colostro coletado 3 h após o parto em Heng (1999).

A composição do colostro variou com o tempo de ordenha, ocasionando diferenças nos teores de extrato seco, cinzas, proteínas e lactose. Já as diferenças observadas entre as amostras de colostro podem ter ocorrido devido a fatores como o idade do bovino, número de parições, estado de saúde entre outros.

### 3.2. Perfil lipídico

A análise da fração lipídica do colostro detectou diversos tipos de ésteres metilados de ácidos graxos, sendo a maioria representada pelo ácido capróico C6:0 (10,87%), ácido mirístico C14:0 (11,15%), ácido palmítico C16:0 (36,94%) e de ácido oleico + elaídico C18:1 (19,64%) como mostra a Tabela 15.

TABELA 15 – PRINCIPAIS FAME ENCONTRADOS EM COLOSTRO BOVINO

Ésteres metilados de ácidos graxos (FAME)	%
Ácido capróico (C6:0)	10,87 ± 3,31
Ácido caprílico (C8:0)	3,05 ± 0,92
Ácido cáprico (C10:0)	1,09 ± 0,14
Ácido láurico (C12:0)	2,36 ± 0,13
Ácido tridecanóico (C13:0)	0,38 ± 0,10
Ácido mirístico (C14:0)	11,15 ± 0,64
Ácido palmítico (C16:0)	36,94 ± 1,82
Ácido palmitoléico (C16:1)	2,83 ± 0,15
Ácido margárico (C17:0)	1,00 ± 0,04
Ácido esteárico (C18:0)	6,47 ± 0,41
Ácido oléico + elaídico (C18:1)	19,64 ± 1,24
Ácido linoléico + linoleaídico (C18:2)	2,63 ± 0,15
Ácido linolênico (C18:3)	0,88 ± 0,06

O cálculo dos ésteres metilados de ácidos graxos (FAME) teórico está descrito a seguir:

$$[\text{FAME}]_{\text{teórico}} = \frac{47,3 \text{ mg (amostra)}}{5 \text{ mL (heptano)}} = 9,46 \text{ mg/mL ou } 9,46 \text{ Kppm}$$

A taxa de conversão dos FAME foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ conversão [FAME]} = \frac{[\text{FAME}] \text{ prático}}{[\text{FAME}] \text{ teórico}}$$

$$\% \text{ conversão [FAME]} = \frac{3852,37 \text{ ppm}}{9460,00 \text{ ppm}} = 40,72 \%$$

Observou-se uma baixa taxa de conversão do FAME (40,72%), indicando uma baixa efetividade do processo de extração. A metodologia de extração adotada poderia ser específica para a extração dos lipídios do leite, a fim de aumentar o rendimento dos lipídios a serem analisados.

Os ácidos graxos encontrados em maior proporção – ácido palmítico (36,94%) e de ácido oleico + elaídico (19,64%) – estão de acordo com os resultados de Collomb *et al.* (2000), onde os valores encontrados por esses autores foram menores (23,9% e 17,36%, respectivamente) em amostras de leite e não de colostro. A predominância dos ácidos palmítico (30,6%) e oléico (22,8%) também foi relatado em MacGibbon e Taylor (2006).

#### 4. Conclusões

Avaliando-se a composição de amostras de colostro de primeira (tempo zero), segunda (12 h) e terceira ordenha (24 h) verificaram-se diferenças nos teores dos componentes, as quais podem ter sido influenciadas pelo tempo de ordenha e heterogeneidade das amostras. A composição diferiu basicamente da primeira para a segunda ordenha, sendo a segunda ordenha muito similar a terceira ordenha.

As variáveis mais influenciadas pela ordenha foram o teor de cinzas, proteínas e lactose. Já com relação ao grupo de amostras foram observadas diferenças significativas no teor de cinzas, proteínas, lactose e densidade. O teor de extrato seco e gordura não diferiu entre as amostras, o que pode ocorrer em função da variabilidade do grupo de amostras e diferentes tempos de ordenha para cada amostra.

Com relação aos ácidos graxos presentes, verificou-se uma predominância do ácido palmítico (36,9%) e ácido oleico + elaídico (19,6%). Outros métodos de extração poderiam ser testados para melhorar a efetividade desta etapa, resultando em valores mais altos de ácidos graxos.

#### Referências

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). **Official methods of analysis**, 16. ed., 4 rev. Washington, 1998.

BELLAMY, W. *et al.*. Antibacterial spectrum of lactoferricin B, a potent bactericidal peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 73, p. 472-478, 1992.

BRINKWORTH, G. D.; BUCKLEY, J. D. Concentrated bovine colostrum protein supplementation reduces the incidence of self reported symptoms of upper respiratory tract infection in adult males. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 228–232, 2003.

CHILLIARD, Y.; FERLAY, A.; DOREAU, M. Contrôle de la qualité nutritionnelle des matières grasses du lait par l'alimentation des vaches laitières : acides gras trans, polyinsaturés, acide linoléique conjugué. **INRA Productions Animales**, v. 14, p. 323-335, 2001.

COLLOMB, M.; BÜHLER, T. Analyse de la composition en acides gras de la graisse de lait. 1. Optimisation et validation d'une méthode générale à haute résolution. **Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene**, v. 91, p. 306-332. 2000.

CUNNINGHAM, J. G. A glândula mamária. In: CUNNINGHAM, J. G. **Tratado de Fisiologia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 2004.

ELFSTRAND, L. *et al.* **Feed or food product composition**. United States Patent 20090311333, Dec. 17, 2009.

FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 1033-1060, 1978.

GAUNT, S. N. Genetic variation in the yields and contents of milk constituents. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 125, p. 73-82, 1980.

GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, n. 1, p. 19-39, 2008.

GRUMMER, R. R. Effect of feed on the composition of milk fat. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 3244-3257, 1991.

HARTMANN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. **Laboratory Practices**, v. 22, p. 475-477, 1973.

HE, F. *et al.* Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrum. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 31, p. 93-96, 2001.

HENG, G. B. Chemical composition of bovine colostrum. In: WHITAKER, J. R. *et al.* (eds). **Food for Health in the Pacific Rim**. Trumbull, USA: Food and Nutrition Press, 1999. pp. 405-411.

IKEDA, M. *et al.* Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 245, p. 549-553, 1998.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). Indicadores IBGE. **Estatística da Produção Pecuária**. Março de 2013. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201204\\_publ\\_completa.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201204_publ_completa.pdf)>. Acesso em 05/08/2013.

Instituto Paranaense de Desenvolvimento Econômico e Social (IPARDES); Instituto Paranaense de Assistência Técnica e Extensão Rural (EMATER) . Bases da produção leiteira. In: \_\_\_\_\_. **Caracterização socioeconômica da atividade leiteira no Paraná**: sumário executivo. Curitiba: IPARDES, 2009. pp.14.

JENNESS, R; WONG, N. P.; MARTH, E. H. Composition of milk. In: WONG, N. P., KEENEY, M.; MARTH, E. H. (eds). **Fundamentals of Dairy Chemistry**, 3 ed. New York, USA: Van Nostrand Reinhold Company, 1988. pp. 2-3.

LILIUS, E. -M.; MARNILA, P. The role of colostral antibodies in prevention of microbial infections. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 14, p. 295-300, 2001.

LONNERDAL, B.; IYER, S. Lactoferrin, molecular structure and biological functions. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 15, p. 93–110, 1995.

- KORHONEN, H. Antimicrobial factors in bovine colostrum. **Journal of the Scientific Agricultural Society of Finland**, v. 49, p. 434-447, 1977.
- MACGIBBON, A. H. K.; TAYLOR, M. W. Composition and structure of bovine milk lipids. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds). **Advanced Dairy Chemistry**. New York: Springer, pp. 1-42, 2006.
- MADUREIRA, A. R. *et al.* Bovine whey proteins: overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, p. 1197-1211, 2007.
- MAMILA, P. *et al.* Prevention and suppression of *Helicobacter felis* infection in mice using colostrum preparation with specific antibodies. **Helicobacter**, v. 8, p. 192-201, 2003.
- MCCANN, K. B., LEE, A., WAN, J. Antiviral activity of milk proteins. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 52, p. 109-118, 2001.
- MCMARTIN, S. *et al.* Heat-treatment of bovine colostrum I: effects of temperature on viscosity and immunoglobulin G. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2110-2118, 2006.
- MEHRA, R.; MARNILA, P.; KORHONEN, H. Milk immunoglobulins for health promotion. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1262-1271, 2006.
- MONTGOMERY, D. C. **Design and analysis of experiments**, 8 ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2012.
- NABET, P.; LINDEN, G. **Constituants bioactifs in lait, nutrition et santé**. Paris: Tec. & Doc, 2001.
- NARDONE, A. *et al.* Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 838-844, 1997.
- OONA, M. *et al.* *Helicobacter pylori* in children with abdominal complaints: Has immune bovine colostrum some influence on gastritis? **Alpe Adria Microbiology Journal**, v. 6, p. 49-57, 1997.
- PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 285-297, 1997.
- PAN, Y. *et al.* Antiviral properties of milk proteins and peptides. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1252-1261, 2006.
- PARODI, P. Milk fat in human nutrition. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 59, p. 3-59, 2004.
- PLAYFORD, R. J. *et al.* Bovine colostrum is a health food supplement which prevents NSAID induced gut damage. **Gut**, v. 44, p. 653-658, 1999.
- ROY, M. K. *et al.* Peptides from the N-terminal end of bovine lactoferrin induce apoptosis in human leukemic (HL-60) cells. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 2065-2074, 2002.
- SANTOS, G. T. *et al.* Importância do manejo e considerações econômicas na criação de bezerras e novilhas. In: SANTOS, G. T. *et al.* (org.). **Anais do II Sul-Leite: Simpósio sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, v. 1. 1 ed. Maringá - PR: Gráfica e Editora Sthampa, pp. 239-267, 2002.
- SÉVERIN, S.; WENSHUI, X. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 645-656, 2005.
- SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro do leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 397-409, 2004.
- STEWART, S. *et al.* Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage and feeding of fresh bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2571-2578, 2005.
- STOTT, G. H.; DAVID, O. LUCAS. **Immunologically active whey fraction and recovery process**. United States Patent, 4,834,974, Mar. 30, 1989.

United States Department of Agriculture (USDA). **Dairy: World Markets and Trade**. December 2012. Disponível em: < <http://usda01.library.cornell.edu/usda/fas/dairy-market//2010s/2012/dairy-market-12-14-2012.pdf> >. Acesso: 08/01/2012.

WAN, Z. *et al.* Effect of orally administered bovine colostrum on cytokine production in vivo and in vitro in immunosuppressed mice. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 522-527, 2010.

YAMAUCHI, K. Biologically functional proteins of milk and peptides derived from milk proteins. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 272, p. 51, 1992.

YAMAUCHI, K. *et al.* Antibacterial activity of lactoferrin and a pepsin-derived lactoferrin peptide fragment. **Infection and Immunity**, v. 61, p. 719-728, 1993.

ZAPICO, P. *et al.* Activity of goat's milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1136–1138, 1995.

## CAPÍTULO 2

### ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS DE COLOSTRO BOVINO USANDO MÉTODOS MOLECULARES

Publicação: **Recovery and identification of bovine colostrum microflora using traditional and molecular approaches.** Autores: De Dea Lindner, J.; Santarelli, M.; Yamaguishi, C. T.; Soccol, C. R.; Neviani, E. *Food Technology and Biotechnology* 49 (3) 364-368, 2011.

#### 1. Introdução

Técnicas baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) têm sido largamente utilizadas para caracterizar grupos de bactérias ácido lácticas (LAB) e outros microrganismos.

Dentre elas incluem-se a técnica baseada no polimorfismo do comprimento de fragmentos de restrição terminal (*Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism*, T-RFLP), espaçadores intergênicos (tDNA *Intergenic Spacer* PCR, tDNA-PCR) e heterogeneidade de comprimento intragênico (*Length Heterogeneity* PCR, LH-PCR) (LIU *et al.*, 1997; BAELE *et al.*, 2002; GATTI *et al.*, 2008). LH-PCR é um método independente de cultivo que vem sendo utilizado para identificar e monitorar a evolução das populações microbianas de diferentes produtos lácteos (GATTI *et al.*, 2008; LAZZI *et al.*, 2004), silagem de milho (BRUSETTI *et al.*, 2006) e do solo (RITCHIE *et al.*, 2000). É eficiente, confiável e de boa reprodutibilidade. Além disso, os padrões de composição microbiana podem ser obtidos sem a necessidade de isolamento de colônias individuais (LAZZI *et al.*, 2004), e populações dominantes podem ser estimadas qualitativa e quantitativamente de forma mais rápida em comparação com outros métodos.

O consumo de probióticos é crescente no mercado mundial e o isolamento de novas cepas probióticas tem sido bem explorado. Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que conferem um efeito benéfico ao hospedeiro quando consumido em quantidades adequadas (SOCCOL *et al.*, 2010; GUARNER; SCHAAFASMA, 1998). A ANVISA (BRASIL, 2002) define probióticos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Em Soccol (2010) são apresentados alguns microrganismos reconhecidos como probióticos e usados na formulação de produtos comerciais (Tabela 16).

TABELA 16 – MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS USADOS EM FORMULAÇÕES COMERCIAIS

<b>Microrganismo</b>	<b>Código</b>	<b>Empresa / produto</b>	<b>Referência</b>
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	ATCC 15703		KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Bb-12	Chr. Hansen	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	Bb-11	Chr. Hansen	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Bifidobacterium breve</i>			KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Bifidobacterium essensis</i>		Danone® (Activia)	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Bifidobacterium infantis</i>	Shirota Immunitas®	Yakult Danone®	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004); AZUMA, YAMAUCHI e MITSUOKA (1984)
<i>Bifidobacterium lactis</i>	Bb-02 Lafti™ B94	DSM	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Bifidobacterium</i>	CRL 431		KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Bifidobacterium longum</i>	BB536 SBT-2928 UCC 35624	Morinaga Milk Industry Snow Brand Milk Products UCCork	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Bacillus lactis</i>	DR10	Danisco (Howaru™)	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Enterococcus faecium</i>			MITRA e GOLAM (1990)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	LA-1 / LA-5 NCFM DDS-1 SBT-2062	Chr. Hansen Rhodia Nebraska Cultures Snow Brand Milk Products	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)



**Continuação**

<b>Microrganismo</b>	<b>Código</b>	<b>Empresa / produto</b>	<b>Referência</b>
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Lb12		KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus casei</i>	Shirota	Yakult (Yakult®)	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus casei</i>	Immunitas®	Danone®	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus</i>			KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus fermentum</i>	RC-14	Urex Biotech	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus</i> GG			KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004); OKSANEN et al. (1990); SALMINEN e DEIGHTON (1992)
<i>Lactobacillus helveticus</i>	B02		KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus lactis</i>	L1A	Essum AB	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus paracasei</i>	CRL 431	Chr. Hansen	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG GR-1 LB21 271	Valio Urex Biotech Essum AB Probi AB	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v Lp01	Probi AB	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)

## Continuação

Microrganismo	Código	Empresa / produto	Referência
<i>Lactobacillus reuteri</i>	SD2112 / MM2	Biogaia	KRISHNAKUMAR e GORDON (2001); HOLM (2003); PLAYNE, BENNET e SMITHERS (2003); SHAH (2004)
<i>Lactobacillus salivarius</i>			KOLLARITSCH et al. (1989)
<i>Saccharomyces boulardii</i>			CETINA-SAURI e BASTO (1994) HOCHTER, CHASE e HAGENHOFF (1990)

A microflora láctica natural do colostro bovino pode ser uma fonte potencial para o isolamento de novos microorganismos probióticos. Este estudo teve por objetivo detectar e identificar a microflora do colostro bovino pelo método de cultura dependente, pelo sequenciamento do gene 16S rRNA e pelo método de LH-PCR.

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Amostragem

As amostras de colostro bovino foram provenientes da Fazenda Santa Cecília – Piraquara-PR. O colostro foi proveniente de 2 vacas da raça Holandesa (425 e 539) de mesma idade e segunda parição. A ordenha foi realizada 2 vezes ao dia (às 7 h da manhã e 17 h da tarde) nos 3 primeiros dias após o parto (tempo 0, 12, 24, 36, 48, 60 h, n=6). As vacas selecionadas para este estudo não apresentaram problemas de saúde e não estavam em tratamento com antibióticos.

A assepsia dos tetos foi realizada com solução sanitizante e de iodo a 0,5%. As amostras de colostro foram coletadas assepticamente em tubos estéreis de 50 mL, sendo imediatamente congeladas a -20°C. O descongelamento das amostras foi realizado em banho de gelo.

### 2.2. Recuperação bacteriana

Alíquotas de colostro (50 mL) diluído 1:10 em tampão citrato de sódio 50 mM pH = 7,0 foram plaqueadas em profundidade em meio com ágar. Com o objetivo de contar e

recuperar a população bacteriana cultivável, utilizaram-se diferentes condições de temperatura e tempo. Para a condição aeróbica foi feita a contagem total em placa em ágar Milk Plate (MPCA; Oxoid S.p.A, Milan, Italy) incubada a 37°C por 48 h. Para a condição anaeróbica, os lactobacilos foram recuperados em meio MRS ágar (Oxoid SpA) suplementado com 0,05% de cisteína (MRS CYS) pH 5,4 incubados a 25 e 37°C por 72 h, e os estreptococos foram recuperados em meio M17 ágar (Oxoid S.p.A.), incubados a 25 e 37 ° C por 72 h. As contagens foram realizadas em triplicata. O desvio padrão das médias foi calculado.

### 2.3. Identificação bacteriana pelo sequenciamento do gene 16S rRNA

Um número representativo de unidades formadoras de colônias (UFC) de cada condição de crescimento foi selecionado, baseado na morfologia macroscópica. Um total de 29 cepas foram cultivadas em meio MRS CYS (bacilos) ou M17 (cocos), e o DNA genômico das culturas *overnight* foi extraído usando o Chelex 100 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) como descrito por Giraffa *et al.* (2003). Uma alíquota de 200 µL das culturas foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 min. Os *pellets* foram suspensos duas vezes em 1,5 mL de água estéril e centrifugados a 10.000 rpm por 5 min. Os *pellets* foram ressuspensos em 245 µL tampão TE<sub>0,1</sub> (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8). Adicionou-se 5 µL de uma solução de lisozioma (50 mg/mL) (Sigma-Aldrich Co.). Os tubos foram incubados a 56°C por 45 min. Após, foram adicionados 196,2 µL de tampão TE<sub>0,1</sub>, 5 µL de ditiotreitól 1 M, 20 µL de EDTA 0,25 M (ácido etilenodiamino tetra acético), 25 µL de SDS 10% (p/v) e 3,8 µL de proteínase K (20 mg/L). Os tubos foram incubados a 37°C por 1 h. Adicionou-se 500 µL da solução Chelex 5% (p/v) e incubou-se a 56°C por 15-30 min. Os tubos foram agitados por 10 segundos e imersos em banho-maria a 100°C por 8 min. Centrifugou-se a 10.000 rpm por 2 min a 4°C. O sobrenadante contendo o DNA foi diluído 1:10 (v/v) em água estéril e um volume de 1 µL foi usado para cada 25 µL de amplificação por PCR. As frações foram armazenadas a -15 a -25°C e descongeladas e centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min antes do uso. A presença do DNA foi confirmado em gel de agarose com brometo de etídio 1,5%, e a concentração e a pureza do DNA foi determinada por espectrofotômetro em 260-280 nm (JascoV-530 spectrophotometer, Jasco Inc, Tokyo, Japan).

A amplificação e sequenciamento do DNA seguiram a metodologia de Giraffa *et al.* (2003). O volume de reação final foi de 20µL. Na reação foram adicionados, 0,2 mM de DNTP (desoxi-nucleotídeo-trifosfato), 0,2 µL de tampão Taq, 0,5 µM do *primer* 16 46F (GCY TAA CAC ATG CAA GTC GA), 0,5 µM do *primer* 16 536R (GTA TTA CCG CGG

CTG CTG G), 0,5 U/100  $\mu$ L de AmpliTaq, 1,5 mM de cloreto de magnésio e 1  $\mu$ L de DNA total extraído anteriormente. O ciclo de amplificação consistiu em uma etapa inicial de desnaturação a 95°C por 10 min. Posteriormente foram realizados 30 ciclos de 95°C por 30 segundos, 59°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. O alongamento final foi realizado a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese de capilaridade no analisador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sob condições desnaturantes. As sequências nucleotídicas foram comparadas ao BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) que alinha as sequências obtidas com as sequências do gene 16S rRNA das bactérias disponíveis no banco de dados EMBL (European Molecular Biology Laboratory) (2010).

#### 2.4. Extração do DNA total de colostro bovino

O método usado para a extração do DNA total das amostras de colostro foi baseado em Murphy, Shariflou e Moran (2002) e Rasolofo *et al.* (2010), com modificações. Alíquotas de 10 mL de amostra foram clarificadas através da adição de 2 mL de EDTA 0,5M pH 8,0, seguida de centrifugação a 9.000 rpm a 4°C por 30 min. As amostras foram então incubadas a -20°C por 10 min e o sobrenadante contendo a gordura e as proteínas solúveis foi descartado. O *pellet* celular foi lavado 2 vezes com 1 mL de tampão sacarose (12% sacarose, 25 mM Tris-HCl, pH 8,0). O *pellet* foi suspenso em 0,4 mL de tampão sacarose contendo 800  $\mu$ g de lisozima (Sigma-Aldrich Co.). A suspensão foi incubada por 1 h a 37°C. Tampão sacarose (78 mL) contendo 5 mL de SDS 10 % (sodium dodecyl sulphate), 12 mL de 250 mM EDTA (pH 8,0) e 5 mL de proteinase K (20 mg/mL) foi adicionada a suspensão e incubada por 1 h a 55°C. Depois desta segunda digestão, 65 mL de tampão sacarose e 135 mL de NaCl (5M) foram adicionados à suspensão. A fim de eliminar as proteínas contaminantes, tratou-se a suspensão 2 vezes com 700 mL de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se a 18000 $\times$ g por 15 min a 4°C. A fase aquosa superior foi coletada e transferida para um novo tubo para uma posterior extração com 700 mL de clorofórmio. A fase aquosa superior foi coletada novamente, e 700 mL de etanol 96% a -20°C foi adicionado. A suspensão foi mantida a -80°C *overnight*. O DNA foi pelletizado por centrifugação a 18.000  $\times$  g por 30 min a 4°C. O *pellet* foi lavado 2 vezes com 700 mL de etanol 70% a -20°C, e depois drenado e secado. O DNA foi suspenso em 30 mL de água deionizada estéril. O DNA foi quantificado pela medição da absorbância a 260 nm em espectrofotômetro (Jasco V-530), diluído a 20 ng/mL, e estocado a -20°C até o uso.

## 2.5. LH-PCR do DNA extraído do colostro

As regiões variáveis V1 e V2 dos genes 16S rRNA extraídos do colostro foram analisados pela técnica de LH-PCR como descrito por Lazzi *et al.* (2004). Nesse caso, utilizou-se *primer* senso fluorescente 63F (5'-[6FAM] CAGGCC TAA CAC ATG CAA GTC-3') e *primer* anti-senso 355R (5'-GCT GCC TCC CGT AGG AGT-3'), já que com a utilização desses *primers* foi estimado que os comprimentos teóricos dos fragmentos estariam entre 276–327 pares de bases (pb) para o domínio A das eubactérias (SUZUKI; RAPPÉ; GIOVANNONI, 1998). A amplificação foi realizada segundo a metodologia de Giraffa *et al.* (2003), conforme descrito anteriormente. Os produtos amplificados foram separados por eletroforese de capilaridade no analisador genético ABI Prism 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sob condições desnaturantes. Os picos dos perfis eletroferogramas, os quais correspondem a *Amplicons* de diferentes comprimentos, foram atribuídos a espécies bacterianas usando uma base de dados LH-PCR obtidos em estudos anteriores (GATTI *et al.*, 2008; LAZZI *et al.*, 2004). Os tamanhos dos *Amplicons* foram determinados pelo software GeneMapper v. 4.0 (Applied Biosystems). Os perfis LH-PCR foram analisados tendo como referência um tamanho padrão interno (*Local Southern Size*) e somente picos com 150 unidades de fluorescência ou maiores foram considerados.

## 3. Resultados e Discussão

As amostras representativas de colostro (tempo de ordenha 0, 24 e 60 h) de 2 bovinos foram estudadas quanto a sua população bacteriana. A Tabela 17 mostra a contagem da população total cultivável em MPCA, estreptococos em M17 e lactobacilos em MRS CYS pH 5,4.

TABELA 17 – CONTAGEM BACTERIANA EM DIFERENTES CONDIÇÕES E MEIOS DE AMOSTRAS DE COLOSTRO BOVINO

Amostra / tempo	MPCA a 37°C (log UFC/mL)	M17 a 25°C (log UFC/mL)	M17 a 37°C (log UFC/mL)	MRS CYS pH 5,4 a 25°C (log UFC/mL)	MRS CYS pH 5,4 a 37°C (log UFC/mL)
425 / 0	5,43 ± 1,36	2,89 ± 0,78	2,61 ± 1,15	1,95 ± 0,63	2,13 ± 1,33
425 / 24	4,53 ± 2,16	2,89 ± 1,33	2,21 ± 2,02	2,00 ± 1,45	2,61 ± 1,15
425 / 60	5,00 ± 1,44	3,00 ± 1,45	2,18 ± 1,15	2,18 ± 0,55	2,17 ± 1,10
539 / 0	5,10 ± 1,80	2,05 ± 0,20	2,52 ± 1,28	2,36 ± 1,19	2,03 ± 0,77
539 / 24	5,17 ± 1,33	2,55 ± 1,19	3,02 ± 0,42	1,25 ± 1,20	2,35 ± 0,85
539 / 60	5,89 ± 1,16	2,87 ± 1,24	2,76 ± 1,24	1,97 ± 1,52	2,05 ± 1,36

As amostras de colostro coletadas assepticamente apresentaram uma baixa contagem bacteriana, o que está de acordo com os resultados relatados por Rindsig e Bodoh (1977) e Stewart *et al.* (2005). A contagem microbiana cultivável total foi similar entre as ordenhas durante os 3 dias de coleta após o parto (Tabela 17).

A contagem de bactérias ácido lácticas provenientes do colostro foi inferior a 3 log UFC/mL (Tabela 17). No colostro foram encontrados estreptococos (estimados em 3 log UFC/mL a 25°C) e lactobacilos termófilos (estimados em 2,61 log UFC/mL a 37°C). As temperaturas usadas foram selecionadas para maximizar a recuperação e isolamento das bactérias lácticas. A microflora do colostro foi parcialmente estimada pelo estudo de 29 cepas isoladas nos meios M17 e MRS CYS pH 5,4. Dentre elas, 13 espécies cultivadas foram identificadas pelas sequências do gene 16S rRNA, ilustrando a biodiversidade presente nas amostras de colostro (Tabela 18).

TABELA 18 - CEPAS ISOLADAS DAS AMOSTRAS DE COLOSTRO

Código da cepa	Número de isolados	Meio de cultivo	Cepas referência	Código de acesso	% Equivalência
1,4	2	MRS CYS pH 5,4	<i>Lactobacillus casei</i>	HM058411	100
2	1	M17	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	FJ858975	98
3,8,9,10,11,13,15, 17,18,19,21,25	12	M17	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	AY688044	99
5,6	2	MRS CYS pH 5,4	<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	GU361828	99
7	1	MRS CYS pH 5,4	<i>Propionibacterium acnes</i>	EF680442	99
12,16	2	M17	<i>Brachybacterium</i> sp	AB449755	98
14	1	M17	<i>Streptococcus uberis</i>	AM946015	99
20	1	M17	<i>Paenibacillus barcinonensis</i>	FJ174659	99
22	1	M17	<i>Bacillus circulans</i>	EU653002	100
23	1	M17	<i>Macrococcus caseolyticus</i>	GU904705	99
24,26	2	M17	Clone bacteriano não cultivável	GQ055058	99
27,29	2	MRS CYS pH 5,4	<i>Paenibacillus graminis</i>	AB428571	99
28	1	M17	<i>Cellulosimicrobium funkei</i>	AY729960	99

A maior diversidade das espécies foi recuperada em meio M17 (9 espécies). *Staphylococcus chromogenes* foi a espécie mais frequentemente isolada. Vale ressaltar a importância do controle desse microrganismo que tem sido relacionado a casos de mastite subclínica, a qual tem impacto na contagem de células somáticas e consequentemente no volume e qualidade do leite produzido (TRINIDAD; NICKERSON; ALLEY, 1990).

Também, 2 bactérias lácticas potencialmente probióticas (*Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium pseudolongum*) foram recuperadas em MRS CYS pH 5,4. Devido aos efeitos dos probióticos promotores da saúde (SOCCOL *et al.*, 2010; MARCO, PAVAN, KLEEREBEZEM, 2006), significativos esforços têm sido feitos para descobrir e explorar novas cepas com propriedades probióticas cientificamente comprovadas de ambientes naturais, como por exemplo o trato intestinal humano (TURRONI *et al.*, 2009). Os biotipos *L. casei* e *B. pseudolongum* isolados serão caracterizados em trabalhos futuros.

O estudo da ecologia microbiana do colostro mostra-se limitada pelo uso de métodos tradicionais de cultivo em ágar ou técnicas de cultura-dependentes. Métodos tradicionais de investigação de populações microbianas revelam tipicamente a maioria dos microorganismos presentes, especialmente aqueles que são capazes de crescer a um nível detectável sob condições específicas de cultivo (NEVIANI *et al.*, 2009). Estes métodos frequentemente subestimam componentes menos abundantes da microflora, os quais poderiam ser igualmente importantes. O isolamento microbiano de uma matrix complexa em meio sintético requer ótimas condições para se conhecer as maiores necessidades nutricionais das cepas a serem desenvolvidas. As condições ideais reproduziriam o ecossistema natural no meio de cultivo (NEVIANI *et al.*, 2009).

A fim de superar as limitações já relatadas dos métodos de cultura-dependentes, investigar a evolução, e quantificar parcialmente a população microbiana presente no colostro, amostras foram submetidas a um método independente do cultivo baseado na reação de PCR, o LH-PCR. A Figura 16 mostra o perfil LH-PCR obtido para amostras de colostro 425 coletado 36 h após o parto.

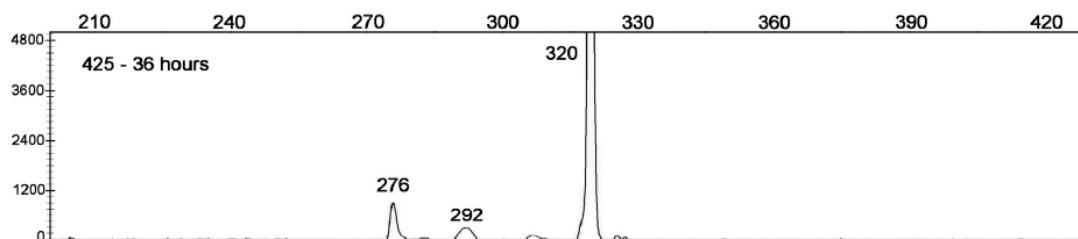


FIGURA 16 – ELETROFEROGRAMA DO LH-PCR AMOSTRA 425 TEMPO 36H

Os eletroferogramas dos resultados mais representativos para a amostra de colostro 539 coletado às 0, 12, 24, 48 e 60 h após o parto são mostrados na Figura 17. O eixo X mostra o tamanho do pico em pares de bases (pb) e o eixo Y mostra a intensidade do pico nas relativas unidades fluorescentes.

Os diferentes tamanhos de fragmentos nos perfis LH-PCR foram atribuídos a espécies bacterianas usando uma base de dados previamente estabelecida (GATTI *et al.*, 2008; LAZZI *et al.*, 2004). Os picos detectados no eletroferograma da amostra 425 às 36 h (Figura 16) foram  $276\pm 1$  pb (não atribuído),  $292\pm 1$  pb (não atribuído) e  $320\pm 1$  pb (atribuído a *Lactococcus lactis* ou *Staphylococcus* sp. ou *Streptococcus thermophilus*). Apenas uma das espécies atribuídas a  $320\pm 1$  pb foi isolada das placas de ágar (Tabela 15). Algumas cepas representativas dessas espécies poderiam estar viáveis, porém possivelmente poderiam não ser cultivadas. Devido a sua baixa sensibilidade, a técnica LH-PCR é somente semi-quantitativa e necessita de contagem microbiana maior que 5 log UFC/mL (LAZZI *et al.*, 2004) para a quantificação do padrão de DNA. Como esperado, a quantidade de DNA de algumas espécies da amostra 425 foi baixa demais para ser amplificada, resultando em perfis livres de picos consideráveis.

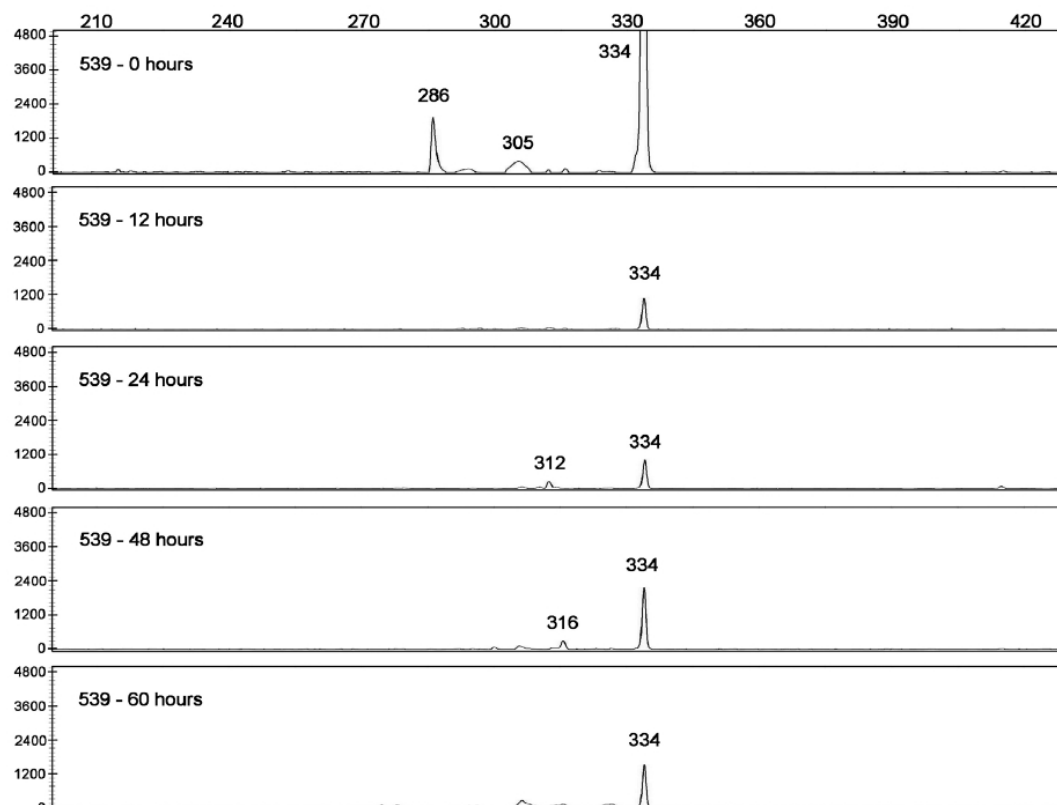


FIGURA 17 – ELETROFEROGRAMA DO LH-PCR AMOSTRA 539 EM DIFERENTES TEMPOS



Os picos detectados nos eletroferogramas da amostra 539 (Figura 17) foram 0 h – 286±1 pb (não atribuído), 305±1 pb (não atribuído) e 334±1 pb (*Lactobacillus helveticus* ou *L. casei*); 12 h – 334±1 pb (*L. helveticus* ou *L. casei*); 24 h – 312±1 pb (*Kocuria kristinae*) e 334 ±1 pb (*L. helveticus* ou *L. casei*); 48 h – 316±1 pb (não atribuído) e 334±1 pb (*L. helveticus* ou *L. casei*); e 60 h – 334±1 pb (*L. helveticus* ou *L. casei*). Alguns perfis tiveram picos com intensidade de fluorescência menor que a detectada no tempo inicial (150 unidades de fluorescência).

O LH-PCR confirmou a presença de algumas espécies isoladas e identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA, como por exemplo, *L. casei*, sendo que outras espécies identificadas por picos não foram recuperadas nos meios de cultivo testados. Estas cepas poderiam ser viáveis, mas dificilmente cultiváveis. A área de cada pico pode estimar a porção relativa de cada componente da população microbiana (SUZUKI; RAPPÉ; GIOVANNONI, 1998). Utilizando esta técnica, pode-se estimar quantitativa e qualitativamente a composição das populações dominantes dentro de uma comunidade microbiana. *L. casei* foi a principal espécie presente no colostro, segundo as técnicas de identificação (sequenciamento do gene 16S rRNA e LH-PCR).

#### 4. Conclusões

O método para a extração total do DNA foi adaptado ao colostro e resultou na recuperação de baixas quantidades de DNA. O uso da técnica tradicional a qual utilizou o sequenciamento do gene 16S rRNA analisou 29 cepas isoladas e identificou 13 espécies bacterianas. Este método caracterizou a população microbiana do colostro bovino em diferentes fases de maturação e mostrou-se como uma alternativa para a análise de microrganismos que estão presentes mas não conseguem se desenvolver (método independente do cultivo). Bactérias ácido lácticas e bifidobactérias estiveram presentes nas amostras de colostro analisadas e as espécies isoladas poderiam ser estudadas quanto às suas características probióticas.

#### Referências

- AZUMA, N.; YAMAUCHI, K.; MITSUOKA, T. Bifidus growth-promoting activity of a glycomacropeptide derived from human k-casein. **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 48, p. 2159–2162, 1984.
- BAELE, M. *et al.* Identification of *Lactobacillus* species using tDNA-PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, p. 263–271, 2002.

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD, USA. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST> >. Acesso: 08/06/2010.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução nº 2, de 7 de janeiro de 2002**. Aprova o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC\\_02\\_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC_02_2002.pdf/eea25458-6317-4c28-9f57-1982ee32623c) >. Acesso em 22/05/2013.

BRUSETTI, L. *et al.* Usefulness of length heterogeneity-PCR for monitoring lactic acid bacteria succession during maize ensiling. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 56, p. 154–164, 2006.

CETINA-SAURI, G.; BASTO, G.S. Therapeutic evaluation of *Saccharomyces boulardii* in children suffering diarrhoea. **Annales de Pédiatrie**, v. 41, p. 397–400, 1994.

European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Nucleotide Sequence Database (EMBL-Bank), European Bioinformatics Institute, Cambridge, UK. Disponível em: < <http://www.ebi.ac.uk/embl> >. Acesso: 08/06/2010.

GATTI, M. *et al.* Dynamics of whole and lysed bacterial cells during Parmigiano-Reggiano cheese production and ripening. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 6161–6167, 2008.

GIRAFFA, G. *et al.* Molecular typing of *Lactobacillus delbrueckii* of dairy origin by PCR–RFLP of protein coding genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, p. 163–172, 2003.

GUARNER, F.; SCHAAFASMA, G. Probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 39, p. 237–238, 1998.

HOCHTER, D.U.; CHASE, W.; HAGENHOFF, G. *Saccharomyces boulardii* in acute adult diarrhoea: efficacy and tolerability of treatment. **Münch Med Wochenschr**, v. 132, p. 188–192, 1990.

HOLM, F. Gut health and diet: the benefits of probiotic and prebiotics on human health. **The World of Ingredients**, v. 2, p. 52–55, 2003.

KRISHNAKUMAR, V.; GORDON, I.R. Probiotics: challenges and opportunities. **Dairy Industries International**, v. 66, p. 38–40, 2001.

KOLLARITSCH, H.H. *et al.* Prevention of traveller's diarrhoea: comparison of different non-antibiotic preparations. **Travel Medicine International**, v. 7, p. 9–18, 1989.

LAZZI, C. *et al.* Evaluation of bacterial communities belonging to natural whey starters for Grana Padano cheese by length heterogeneity-PCR. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 481–490, 2004.

LIU, W.T. *et al.* Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rRNA. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, p. 4516–4522, 1997.

MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 17, p. 204–210, 2006.

MITRA, A.K.; GOLAM, H.R. A double-blind, controlled trial of Bioflorin (*Streptococcus faecium* SF68) in adults with acute diarrhoea due to *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli*. **Gastroenterology**, v. 99, p. 1149–1152, 1990.

MURPHY, M.A.; SHARIFLOU, M. R.; MORAN, C. High quality genomic DNA extraction from large milk samples. **Journal of Dairy Research**, v. 69, p. 645–649, 2002.

NEVIANI, E. *et al.* Recovery and differentiation of long ripened cheese microflora through a new cheese-based cultural medium. **Food Microbiology**, v. 26, p. 240–245, 2009.

- OKSANEN, P.J. *et al.* Prevention of traveler's diarrhoea by *Lactobacillus* GG. **Annals of Medicine**, v. 22, p. 53–56, 1990.
- PLAYNE, M.J.; BENNET, L.E.; SMITHERS, G.W. Functional dairy foods and ingredients. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 242–264, 2003.
- RASOLOFO, E. A. *et al.* Molecular analysis of bacterial population structure and dynamics during cold storage of untreated and treated milk. **International Journal of Food Microbiology**, v. 138, p. 108–118, 2010.
- RINDSIG, R. B.; BODOH, G.W. Growth of calves fed colostrum naturally fermented, or preserved with propionic acid or formaldehyde. **Journal of Dairy Science**, v. 60, p. 79–84, 1977.
- RITCHIE, N. J. *et al.* Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterize microbial communities in soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 1668–1675, 2000.
- SALMINEN, A.; DEIGHTON, M. Lactic acid bacteria in the gut in normal and disordered states. **Digestive Diseases**, v. 10, p. 227–238, 1992.
- SHAH, N.P. Probiotics and prebiotics. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v.15, p. 13–16, 2004.
- SOCCOL, C. R. *et al.* The potential of the probiotics: a review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 413–434, 2010.
- STEWART, S. *et al.* Preventing bacterial contamination and proliferation during the harvest, storage, and feeding of fresh bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 88, p. 2571–2578, 2005.
- SUZUKI, M.; RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. Kinetic bias in estimates of coastal picoplankton community structure obtained by measurements of small-subunit rRNA gene PCR amplicon length heterogeneity. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, p. 4522–4529, 1998.
- TRINIDAD, P.; NICKERSON, S.C.; ALLEY, T.K.. Prevalence of intramammary infection and teat colonization of unbred and primigravid dairy heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 73, p. 107–114, 1990.
- TURRONI, F. *et al.* Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 1534–1545, 2009.

### CAPÍTULO 3

## ESTUDO DE TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO DAS IMUNOGLOBULINAS G DE COLOSTRO BOVINO

Patente: **Processo para a recuperação, encapsulação e estabilização de imunoglobulinas de colostro bovino.** Inventores: Soccol, C. R.; Vandenberghe, L. P. de S; Yamaguishi, C. T. Número INPI: BR 10 2013 027393 7. Out/2013.

### 1. Introdução

Considerando que, o colostro bovino pode ser uma fonte bem mais interessante de imunoglobulinas G quando comparado ao leite bovino, objetivou-se nessa etapa do estudo testar diferentes técnicas para a recuperação e purificação dessas proteínas visando a sua aplicação em um produto nutracêutico e/ou funcional. Vale ressaltar que a etapa de purificação do colostro torna-se imprescindível já que a legislação brasileira não permite a adição de colostro bruto em leite ou derivados lácteos (BRASIL, 2013). Além disso, a presença de colostro na forma *in natura* causa inconvenientes tecnológicos como a desnaturação das proteínas dominantes do soro do colostro durante o tratamento térmico e consequente impregnação de resíduos no equipamento e desenvolvimento de odores e sabores indesejáveis nos produtos lácteos (CHRISTIANSEN; GUO; KJELDEN, 2010).

#### 1.1. Colostro bovino como fonte da imunoglobulina G

As imunoglobulinas (Igs) pertencem a um grupo de proteínas globulares produzidas pelos linfócitos B e que podem exercer atividade protetora na mucosa intestinal contra microrganismos patogênicos. Estas se acumulam na glândula mamária no período pré-parto e são secretadas no colostro e no leite. No colostro bovino elas estão divididas em Imunoglobulina G (IgG), Imunoglobulina M (IgM) e Imunoglobulina A (IgA), sendo que a Imunoglobulina E (IgE) também está presente (MADUREIRA *et al.*, 2007). As IgGs representam 85 a 90% das imunoglobulinas totais, sendo que IgM e IgA representam 7% e 5%, respectivamente (LARSON; HEARY; DEVERY, 1980).

As IgGs ainda apresentam subclasses como a imunoglobulina G1 (IgG1) que corresponde a 80-90% do total de IgGs (LARSON; HEARY; DEVERY, 1980). A IgG1 é derivada principalmente do sangue e transportada através das células alveolares mamárias mediadas por um mecanismo receptor ativo. Já a imunoglobulina G2 (IgG2) pode ser derivada do sangue ou sintetizada diretamente no plasma ou por células epiteliais da glândula mamária, sendo transferida às células secretórias mamárias. Tanto a IgA como a IgM são também sintetizadas no plasma ou nas células epiteliais da glândula mamária (LARSON, 1992).

A classe IgG é a que atua com maior funcionalidade podendo se fixar ao complemento ou a outras células como macrófagos, monócitos, polimorfonucleares e alguns linfócitos. Outras funções são a opsonização, prevenção da adesão de microrganismos patogênicos ao revestimento endotelial, inibição da atividade metabólica de bactérias através do bloqueio de enzimas, aglutinação de bactérias e neutralização de toxinas e vírus. A IgM tem funções similares a IgG, sendo eficaz tanto na imobilização do antígeno como na ativação da via clássica do complemento (DOAN *et al.*, 2008). Já a IgA é um monômero, geralmente encontrado em secreções como por exemplo lágrimas, saliva, colostro e muco. Essa classe de imunoglobulina possui uma proteína associada denominada de peça secretora ou sIgA, a qual é formada nas células epiteliais e esta se liga à IgA a medida que ela passa pelas secreções. A IgA, por sua vez, não fixa o complemento e nem opsoniza bactérias, mas aglutina antígenos, neutraliza vírus e toxinas bacterianas e previne a adesão de enteropatógenos às células da mucosa intestinal (MARNILA; KORHONEN, 2002; MEHRA; MARNILA; KORHONEN, 2006).

No que diz respeito à estrutura, a IgG é uma glicoproteína que consiste basicamente de 2 cadeias curtas de polipeptídios (com peso molecular de aproximadamente 25 kDa) e 2 cadeias longas (com peso molecular entre 50 a 70 kDa) ligadas por pontes de dissulfeto (MULVIHILL; DONOVAN, 1987; LARSON, 1992) (Figura 18). Essa cadeia possui uma região constante (Fc) e outra variável (Fab), a qual possui sítios de ligação a antígenos na região Fab N-terminal (STANFIELD *et al.*, 1990). Os genes que codificam a região Fc dominante são os primeiros determinantes que caracterizam a classe de imunoglobulina, promovendo o aparecimento de subclasses como a IgG1 e IgG2 (OYENIYI; HUNTER, 1978).

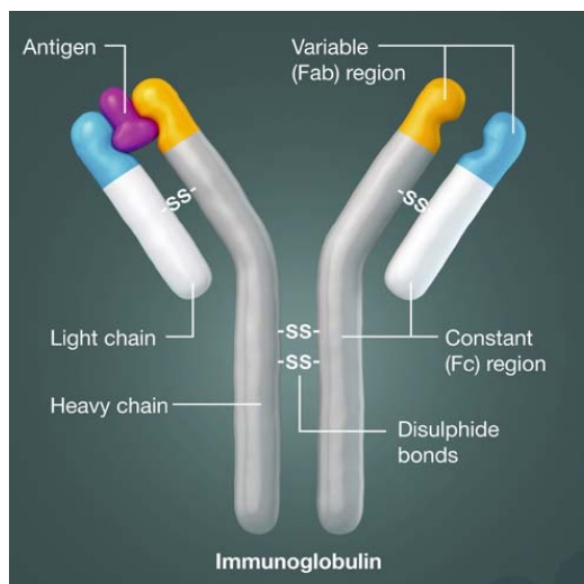


FIGURA 18 - ESTRUTURA DA IMUNOGLOBULINA G

Diferenças quantitativas e qualitativas podem ocorrer entre Igs de diferentes espécies, sendo que as atividades imunológicas variam de acordo com a classe de imunoglobulina (HURLEY, 2003). Newby, Stokes e Bourne (1982) relataram concentrações de 75 mg/mL, 4,4 mg/mL e 4,9 mg/mL, respectivamente, para IgG, IgA e IgM presentes no leite bovino. A composição de imunoglobulinas no colostro e leite bovino é mostrada na Tabela 19.

TABELA 19 – CONCENTRAÇÃO DE IMUNOGLOBULINAS NO COLOSTRO E LEITE BOVINO

Imunoglobulina	Concentração (mg/mL)	
	Colostro	Leite
<b>IgA</b>	<b>3,5</b>	<b>0,13</b>
<b>IgM</b>	<b>8,7</b>	<b>0,04</b>
<b>IgG1</b>	<b>20-200</b>	<b>0,60</b>
<b>IgG2</b>	<b>12,0</b>	<b>0,12</b>
<b>Total IgG</b>	<b>32-212</b>	<b>0,72</b>

FONTE: HENG (1999)

A concentração das IgGs afeta diretamente a qualidade do colostro, já que elas representam a maior parte (85%) das imunoglobulinas presentes. Dados de literatura têm relatado que a concentração de imunoglobulinas pode variar entre 30 a 200 g/L para colostro da primeira ordenha. Colostro com concentrações de IgGs superiores a 50 g/L já são

considerados de alta qualidade. A subclasse IgG1 é a predominante foi estimado que 50 a 100 g por dia ou quantidades superiores a 500 g por semana de IgG1 podem ser transferidas do sangue para as secreções mamárias durante o período de formação do colostro (BRANDON; LASCELLES, 1971). No entanto, a concentração de IgGs no colostro bovino é bastante variável e pode ser afetada por fatores como raça e número de parições, vacinação pré-parto, duração do período de seca e tempo de coleta do colostro (GODDEN, 2008).

A produção de diferentes concentrações de imunoglobulinas no colostro pode ser atribuída às características genéticas da vaca ou volume de colostro produzido (fator de diluição). Muller e Ellinger (1981) verificaram que o conteúdo total de imunoglobulinas de colostro de vacas da raça Holandesa (5,6%) foi menor que a da raça Guernsey (6,3%), Brown Swiss (6,6%), Ayrshire (8,1%) e Jersey (9,0%). A Tabela 20 mostra a composição de imunoglobulinas de diferentes raças de bovinos.

TABELA 20 – COMPARAÇÃO DOS NÍVEIS DE IMUNOGLOBULINAS EM DIFERENTES RAÇAS DE BOVINOS

Raça	Número de bovinos	Imunoglobulina (%)			
		G	A	M	Total
Ayrshire	19	5,99	1,58	0,51	8,08 <sup>a</sup>
Pardo-Suíço	17	5,16	1,00	0,41	6,57 <sup>ab</sup>
Guernsey	12	5,02	0,90	0,39	6,31 <sup>ab</sup>
Holandesa	19	4,12	1,01	0,46	5,59 <sup>b</sup>
Jersey	5	6,65	1,86	0,53	9,04 <sup>a</sup>

FONTE: MULLER e ELLINGER (1981).

NOTA: Os dados representados com letras **a** e **b** sobrescritas diferem significativamente ( $p < 0,05$ ).

A maior concentração de imunoglobulinas no colostro ocorre após o parto. Contudo, um atraso na coleta do colostro de 6, 10 e 14 h após o parto resultaram em decréscimos de 17%, 27% e 33% na concentração de IgG, respectivamente (MOORE *et al.*, 2005).

Alguns estudos revelaram a produção de maiores níveis de imunoglobulinas de acordo com o número de parições. Tyler *et al.* (1999) avaliaram o conteúdo de IgGs em colostros de vacas das raças Holandesa e Guernsey. Eles observaram que na primeira, segunda e terceira parição a concentração de IgGs da raça Holandesa foi de 66, 75 e 97 g/L, respectivamente. Os colostros da raça Guernsey, no entanto, não apresentaram diferenças na concentração das IgGs nas três primeiras parições (119, 113 e 115 g/L, respectivamente).

A exposição a ambientes com altas temperaturas durante a gestação de bovinos pode estar relacionada a colostros com baixos teores de imunoglobulinas G e A, proteínas totais,

caseínas, lactoalbumina, gordura e lactose. Esse fato é associado aos efeitos estressantes provocados pelo calor na ingestão da matéria seca resultando em uma restrição nutricional. O fluxo sanguíneo pode ser reduzido levando a uma insuficiente transferência das IgGs e nutrientes da corrente sanguínea para o úbere ou ineficiente reatividade imunológica dos plasmócitos da glândula mamária que produzem a IgA (NARDONE *et al.*, 1997).

Alguns estudos mostraram um aumento na concentração de anticorpos do colostro contra patógenos como *Pasteurella haemolytica*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, rotavírus e coronavírus, quando vacas em gestação foram vacinadas durante as 3 a 6 semanas precedendo o parto (JONES, COLLINS, AITKIN, 1988; MYERS, SNODGRASS, 1982; WALTNER-TOEWS *et al.*, 1985; ARCHAMBAULT *et al.*, 1988; HODGINS, SHEWEN, 1996). Também fatores como a mastite bovina, que consiste em uma infecção intra-mamária, podem alterar a produção dos níveis de IgG1. O volume de colostro produzido por vacas com mastite é menor que o produzido por vacas não infectadas (MAUNSELL *et al.*, 1998).

A contaminação bacteriana é um aspecto relevante já que as bactérias podem se ligar as Igs no lúmen intestinal ou dificultar a captação e transporte das Igs através das células epiteliais do intestino, interferindo na absorção passiva das Igs. Johnson *et al.* (2007) compararam a administração de 3,8 litros de colostro cru e 3,8 litros de colostro pasteurizado (60°C/60 min) nos níveis de IgGs séricas em bezerros. O colostro cru apresentou uma contagem de bactérias totais de 40.738 UFC/mL, sendo que, o colostro pasteurizado apresentou apenas 813 UFC/mL. Os níveis de IgGs séricas após 24 h do nascimento dos bezerros foram de 22,3 e 18,1 mg/mL para o colostro pasteurizado e cru, respectivamente, o que demonstrou um aumento na absorção das IgGs com o processo de pasteurização.

## 1.2. Benefícios do consumo da imunoglobulina G

O colostro bovino vem sendo utilizado como suplemento na alimentação humana. Estudos indicaram uma melhora em pacientes com diarreia, que sofriam de síndrome da imunodeficiência, colite inflamatória induzida por medicamentos e respostas de fase aguda a cirurgias (HE *et al.*, 2001).

Alguns estudos relataram certas funções conferidas às proteínas do soro bovino dentre as quais podem-se citar sua ação imunomoduladora, antimicrobiana, antiviral, anticâncer, antiúlcera, ação protetora ao sistema cardiovascular, trazendo benefícios também a atividade esportiva e podendo ser aplicado como fator de crescimento (SGARBIERI, 2004).



Diversos estudos têm sido feitos em animais e humanos a fim de avaliar a eficácia das preparações imunológicas de leite. Alguns deles demonstraram bloquear a aderência do patógeno *Streptococcus mutans* a cavidade oral. Shimazaki *et al.* (2001) verificaram que a administração de leite imunizado inibiu significativamente a recolonização de *Streptococcus mutans* na saliva e nas placas quando comparado ao grupo controle. Foi relatado por Brinkworth e Buckley (2003) que a incidência de infecções respiratórias pode ser reduzida com a administração oral Intact™, onde o efeito é atribuído a fatores de crescimento endógenos presentes no colostro.

Também tratamentos utilizando Igs de colostro específicas têm demonstrado reduzir o grau de inflamação e colonização da bactéria *Helicobacter* em ratos (MAMILA *et al.*, 2003) e o grau de inflamação em crianças (OONA *et al.*, 1997). Foi relatado que a ingestão de imunoglobulinas de colostro de vacas que foram imunizadas podem prevenir infecções por rotavírus e por *E. coli* enterotoxigênica em crianças e adultos (DOSKA, 1994). Ensaio clínico com anticorpos específicos de leite bovino mostraram-se efetivos no tratamento contra *Cryptosporidium* (TZIPORI; ROBERTSON; CHAPMAN, 1986), rotavírus (EBINA *et al.*, 1985; HILPERT *et al.*, 1987) e *Shigella flexneri* (TACKET *et al.*, 1992).

As imunoglobulinas presentes no colostro podem ser enriquecidas por concentração do colostro, e aplicadas na saúde de humanos e animais na prevenção de infecções e no controle de doenças (KELLY, 2003). Estes compostos são também de grande valor para o mercado de nutrição esportiva e infantil, de produtos dietéticos (KORHONEN, 2004).

A eficácia da administração oral já foi bem documentada em modelos animais e ensaios clínicos em humanos (HAMMARSTRÖM *et al.* 1994; WEINER *et al.* 1999). A suplementação oral com colostro bovino limitou os efeitos imunodepressivos, melhorando o sistema de defesa em indivíduos que sofreram estresse por exercícios prolongados (4 semanas) (DAVISON; DIMENT, 2010). Também foi demonstrado que a sua administração pode ser preventiva no desenvolvimento de infecção do trato respiratório (BRINKWORTH; BUCKLEY, 2003) e atuar benéficamente na diminuição da glicose no sangue, colesterol total e triglicerídeos em humanos (KIM *et al.*, 2009).

Cockrum (2003) estudou diversos benefícios relacionados a administração oral de um suplemento alimentar a base de colostro bovino, obtido por secagem em spray dryer. Dentre eles estavam a melhora da expressão dos receptores positivos CD11b e CD4 nos linfócitos do sangue, ativação dos leucócitos, aumento da função fagocítica nas células dos macrófagos e nas células polimorfonucleares.

Kothe *et al.* (1987) propôs o uso de uma solução de imunoglobulinas a base de colostro bovino coletado até 30 h após o parto. Segundo esses autores 1 litro da solução de imunoglobulinas 5% filtrada-esterilizada seria apropriada para o tratamento de infecções intestinais bacterianas e virais em humanos e animais. Essa solução poderia ser administrada via oral em crianças prematuras e/ou com infecção intestinal.

### 1.3. Técnicas de quantificação da imunoglobulina G

A separação e quantificação da caseína e proteínas do soro têm sido realizadas por eletroforese capilar de zona, ponto isoeletrico e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (BOBE *et al.*, 1998).

Testes de laboratório usualmente utilizados para a medida ou estimativa da concentração de IgG do soro incluem a imunodifusão radial (RID), imunoensaio turbidimétrico (TIA), ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA), teste de turbidimetria por sulfito de sódio, teste de turbidimetria por sulfato de zinco, atividade gama glutamiltransferase do soro e teste de coagulação glutaraldeído do sangue (ETZEL, STROHBEHN, MCVICKER, 1997; PFEIFFER *et al.*, 1977). Em Gapper *et al.* (2007) são sugeridas diversas técnicas para a identificação e quantificação de IgGs em matrizes complexas como leite e colostro bovino. Dentre elas estão algumas técnicas de cromatografia (líquida, líquida de fase reversa, exclusão por tamanho, troca iônica, por afinidade), de eletroforese (em gel, por capilaridade), baseada em técnicas imunológicas (RID, ELISA, nefelometria, imunoensaio de fluxo lateral, ressonância plasmônica de superfície) ou ainda técnicas físicas, que se baseiam na correlação de uma medida de um parâmetro físico (por exemplo, densidade, gravidade específica, viscosidade, turbidimetria) com a concentração de um componente específico.

A técnica de imunodifusão radial é simples e amplamente disponível e possibilita a análise de colostro ou leite bovino diretamente (FLEENOR; STOTT, 1981), podendo também ser realizada por métodos automatizados (LEVIEUX, 1991). A análise quantitativa de colostro e leite humano, ovino, caprino e equino também têm sido realizada por essa técnica (GAPPER *et al.*, 2007).

#### 1.4. Métodos para a purificação da imunoglobulina G

Processos tecnológicos como tratamentos térmicos, filtração e secagem, que são utilizados com o objetivo de reduzir a carga microbiana e isolar as frações bioativas do colostro bovino, podem degradar e afetar o estado funcional destas moléculas (ELFSTRAND *et al.*, 2002). Informações sobre a estabilidade destes componentes durante e após o processamento, são limitadas, mas necessárias para o estudo e desenvolvimento de tecnologias apropriadas para o escalonamento industrial.

Nos últimos anos, métodos e tecnologias usadas para o isolamento, extração, concentração e purificação de proteínas específicas, como as imunoglobulinas, provenientes do leite/colostro foram desenvolvidas, mas sem êxito para a produção em larga escala (MEHRA; MARNILA; KORHONEN, 2006). Métodos físicos de separação de imunoglobulinas podem ser baseados no peso molecular, ponto isoelétrico e solubilidade.

Métodos de separação por membranas utilizando diferença de pressão vêm sendo utilizados para concentrar, fracionar e/ou purificar soluções. Proteínas tem uma massa molar entre 10.000 e 1.000.000 dáltons (ou 10-1.000 kDa), o que equivale de 2 a 10 nm. Logo, o isolamento de frações protéicas pode ser realizado com o uso de membranas de microfiltração, diafiltração e ultrafiltração. A microfiltração utiliza membranas com poros de 0,1 a 10  $\mu\text{m}$  (100 a 10.000 nm). A ultrafiltração é recomendada para proteínas menores já que utiliza membranas com poros na faixa entre 1 e 100 nm. A diafiltração consiste no uso de membranas de microfiltração ou ultrafiltração com uma alimentação contínua de solvente em vazão equivalente a do permeado (filtrado) (HABERT; BORGES; NOBREGA, 2006).

Com o objetivo de obter uma maior pureza das frações Igs, colostro bovino, equino e caprino foram submetidos a processos de microfiltração (porosidade da membrana 0,1  $\mu\text{m}$ ) combinados com ultrafiltração (membrana de 100 kDa). Esses métodos resultaram na recuperação de 80% das IgGs no microfiltrado, e mais de 90% quando foi usada a ultrafiltração (fração do retentado), levando a uma recuperação global de 64% das IgGs (PIOT *et al.*, 2004).

Stott e Lucas (1989) estudaram dois processos para a recuperação das imunoglobulinas a partir de leite e soro de queijo. No primeiro processo, eles realizaram ultrafiltração do soro em membrana de 10 kDa, para a remoção da lactose, minerais e sais, e membrana de 100 kDa, para a remoção da albumina e outras proteínas menores. No segundo processo eles utilizaram as mesmas membranas (10 e 100 kDa), e uma cromatografia de troca iônica. A fração utilizada foi o retentado da ultrafiltração. Os produtos obtidos do retentado e

fração passada em coluna de cromatografia apresentaram 8% e 50% de imunoglobulinas, respectivamente.

Já Stephen *et al.* (2003) utilizaram trocadores catiônicos (pH 2,5-4,5) para produzir uma fração proteica enriquecida com imunoglobulinas. O processo foi mais efetivo quando foi utilizado o retentado obtido pela ultrafiltração do soro de colostro em membranas de 5 a 50 kDa. O rendimento em imunoglobulinas para o soro doce foi de 40-60% e para o soro ácido foi de 50-80%.

Outras técnicas que podem ser utilizadas na produção de imunoglobulinas de leite ou colostro são a precipitação por sulfato de amônio, cromatografia de troca iônica e processos com membranas. O uso de membranas em tubos de aço inoxidável resultou na recuperação de 90% de imunoglobulinas biologicamente ativas (THOMAS *et al.*, 1992).

A aplicação de mais de uma técnica de purificação mostrou ser bastante efetiva na recuperação das imunoglobulinas. Raymond *et al.* (1986) testaram o fracionamento do soro de colostro bovino através de eletroforese líquida, onde obteve uma fração rica em imunoglobulinas (70-80%). Essa fração foi passada em uma coluna de troca iônica e a solução obtida apresentou 98-100% de imunoglobulinas.

O uso da gel filtração pode ser outra alternativa, e mostrou ser eficiente na recuperação de imunoglobulinas. Van Oss (1982) alcançou um rendimento de 90% utilizando a gel filtração para o isolamento de imunoglobulinas. Rendimentos superiores a este (99% de IgG) foram alcançados por Al Mashikhi e Nakai (1987), que utilizaram a técnica de precipitação por sulfato de amônio e uma coluna de Sephacryl S-300.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1. Coleta e estocagem do colostro**

Os procedimentos para a coleta e estocagem foram os mesmos citados no **item 2.1** do **Capítulo 1**.

## 2.2. Quantificação das imunoglobulinas G

A quantificação das imunoglobulinas G totais (IgG1 e IgG2) foi realizada pelo método de imunodifusão radial (RID), segundo o método de Mancini, Carbonara e Heremsans (1985). Os testes foram realizados em placas de agarose contendo anti-IgG bovina (Kit VMRD, Inc.). Aliquotas de 3  $\mu$ L de amostras diluídas 1:5 ou 1:10 em tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) foram colocadas nos poços. As placas foram incubadas a 20-25°C por 24 h. O diâmetro dos halos de precipitação foram medidos através de uma escala em milímetros (Finescale Comparator, VMRD, Inc.) e correlacionados com a concentração de IgG total em mg/dL. A curva padrão foi construída pela medição do diâmetro do anel de precipitação de 4 concentrações conhecidas de IgG bovina (400, 800, 1600 e 3200 mg/dL) em triplicata (Figura 19).

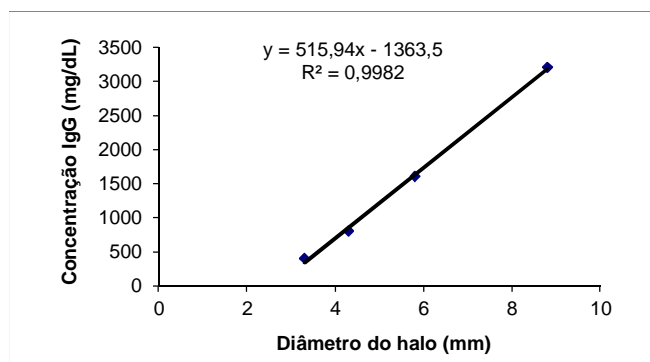


FIGURA 19 – CURVA PADRÃO KIT VMRD

## 2.3. Produção do soro de colostro

A metodologia foi baseada em Elfstrand *et al.* (2002). Colostro bovino foi centrifugado a 4700 rpm por 15 min a 2°C (Centrífuga Sorvall Legend Mach 1.6R, DuPont). A fração lipídica localizada na parte superior foi removida. O colostro desnatado foi submetido a uma coagulação enzimática com coalho comercial da Christian Hansen. O coalho em pó foi diluído 1:20 (p/v) em água estéril. Adicionou-se esta solução ao colostro na proporção de 1:200 (v/v) e incubou-se a 32°C por 30 min. O soro foi removido mediante uma etapa de centrifugação a 5000 rpm por 15 min a 4°C. O *pellet* resultante foi descartado (Figura 20), obtendo-se a fração do soro de colostro, livre da caseína.

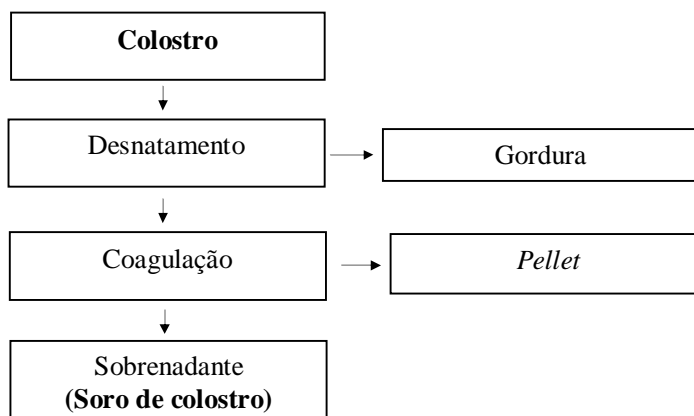


FIGURA 20 - FLUXOGRAMA DO PROCESSAMENTO DO COLOSTRO BOVINO

#### 2.4. Tratamentos do soro de colostro

O processo foi realizado com 3 *Pools* de soro de colostro denominados *Pool 1*, 2 e 3. O *Pool 1* foi proveniente de colostro dos bovinos 363 ( $t = 0$  e 12h) e 544 ( $t = 12$  e 24h). O *Pool 2* foi constituído de amostras dos bovinos 601, 291, 501, 511 e 470 ( $t = 0$  e 12h). Já o *Pool 3* foi constituído de amostras dos bovinos 296 e 360 ( $t = 12$ h). A mistura de diferentes amostras de colostro foi feita com o objetivo de simular diferentes lotes de um processo produtivo. Todas as frações foram analisadas quanto ao teor de IgG total e proteína total.

O soro de colostro foi dialisado em tampão PBS e em membrana de celulose (Sigma-Aldrich) de 76 mm com porosidade de tamanho de 12,4 kDa. Essa etapa foi realizada para a remover proteínas menores e sais minerais. As trocas de tampão foram realizadas a cada 12 h durante 3 dias a 4°C. Após este período o soro foi alíquotado e submetido a 4 tratamentos, a fim de obter frações purificadas com alto teor de imunoglobulina G. Os tratamentos consistiram na micro e ultrafiltração do soro, filtração em carvão ativado, precipitação com solução saturada de sulfato de amônio e gel filtração (Figura 21).

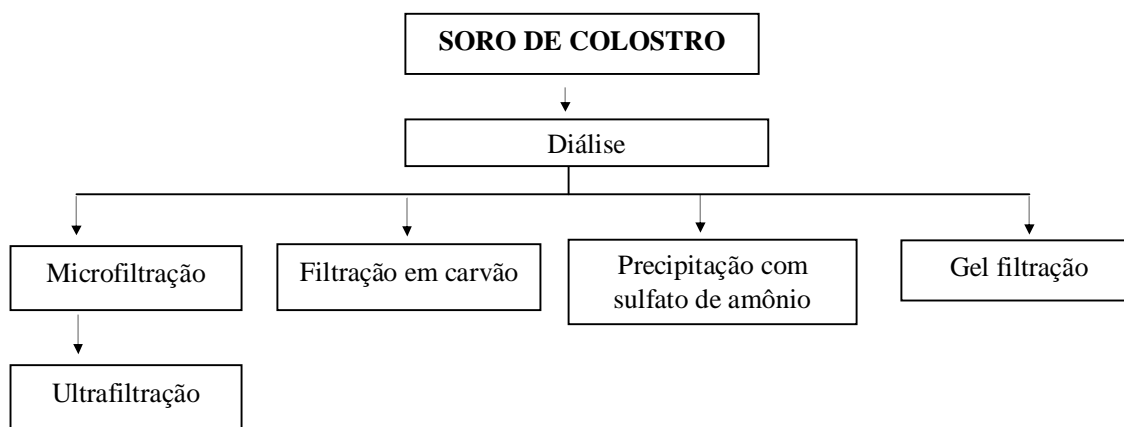


FIGURA 21–TRATAMENTOS DO SORO DE COLOSTRO

#### 2.4.1. Microfiltração e ultrafiltração

O sistema utilizado foi o Quixstand Benchtop System (GE Healthcare) (Figura 22). Os cartuchos utilizados foram de microfiltração (0,22  $\mu\text{m}$ ) e ultrafiltração (300 e 100 kDa). As condições de operação foram 60-80 rpm, pressão de 5-15 psi e fluxo inicial de 1,3-2,5 mL/min. Antes da recuperação das frações foram descartados 15 mL de volume morto.



FIGURA 22 – SISTEMA DE MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO QUIXSTAND BENCHTOP

O soro de colostro dialisado foi passado em membrana de porosidade 0,22  $\mu\text{m}$ , sendo recuperadas as frações do retentado (fração retida na membrana) e do filtrado (fração que passou pela membrana). A fração filtrada em 0,22  $\mu\text{m}$  foi passada em membrana de 300 kDa, sendo recuperadas as frações do retentado e do filtrado. A fração filtrada em 300 kDa também foi passada em membrana de 100 kDa e novamente as frações do retentado e do filtrado foram recuperadas.

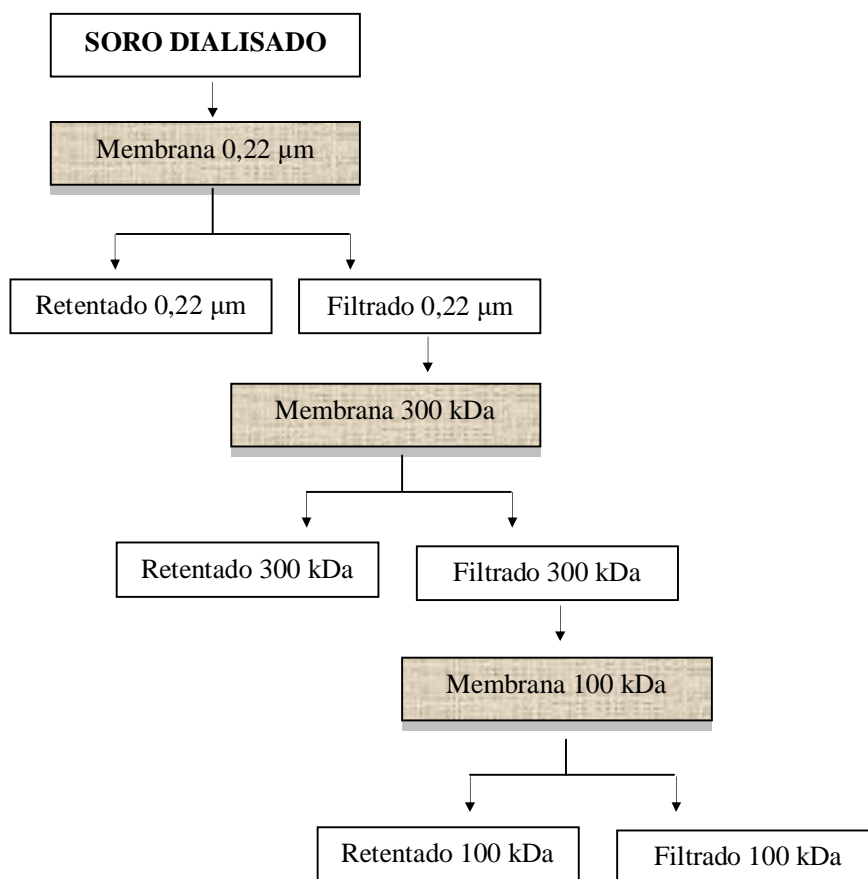


FIGURA 23 – FLUXOGRAMA DAS FRAÇÕES RECUPERADAS DO SISTEMA DE MICRO E ULTRAFILTRAÇÃO

#### 2.4.2. Filtração em coluna de carvão ativado

A filtração do soro dialisado foi realizada em coluna com carvão ativado (Carbomafra) 141S 6 x 12. A coluna foi composta por lã de vidro na parte inferior (4,5 cm) e



carvão ativado na parte superior (3 cm, massa equivalente a 15 g). As dimensões da coluna foram 18,5 cm de altura x 3 cm de diâmetro (Figura 24).

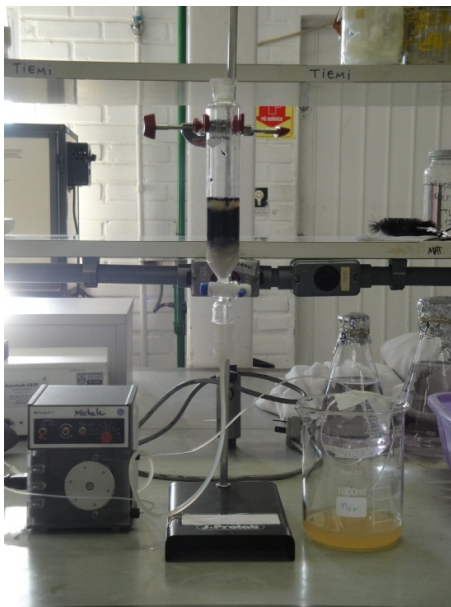


FIGURA 24 – FILTRAÇÃO DO SORO EM COLUNA DE CARVÃO 141S 6X12

Após a montagem da coluna procedeu-se a lavagem com água ultrapura (Milli-Q) a fim de se obter o empacotamento do carvão. Aliquotas de 150 a 250 mL de soro foram passadas na coluna de carvão, desprezando-se um volume inicial de 20 mL (volume morto). O volume recuperado foi analisado quanto ao teor de IgG total e proteína total. Adicionou-se o mesmo volume de água ultrapura (Milli-Q) e recuperou-se o eluído. O teor de IgG total e proteína total do eluído também foi analisado.

#### 2.4.3. Precipitação do soro com sulfato de amônio

A precipitação com sulfato de amônio foi baseada na técnica de Lambin e Burstein (1982). A metodologia adotada empregou duas etapas: a extração de glicoproteínas e a precipitação com solução saturada de sulfato de amônio. Primeiramente, adicionou-se uma solução dextran sulfato 5% (p/v) gota a gota no soro de colostro na proporção de 1:20, sob agitação e em banho de gelo. Deixou-se a solução em repouso por 30 min, agitando-se a cada 10 min. Após, foi adicionada uma solução de cloreto de cálcio 11% (p/v) na proporção de 1:11, gota a gota, sob agitação e em banho de gelo. Deixou-se em repouso por 30 min.

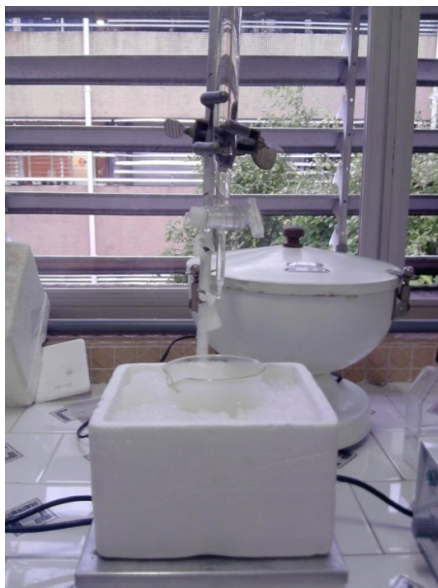


FIGURA 25 – PRECIPITAÇÃO DO SORO COM SULFATO DE AMÔNIO

Centrifugou-se a 9000 rpm por 15 min a 4°C. O *pellet* (glicoproteínas) foi descartado. O sobrenadante foi diluído 1:1 em tampão fosfato salino (PBS). Adicionou-se, gota a gota, a solução saturada de sulfato de amônio 33% (v/v) em relação ao sobrenadante, sob agitação e em banho de gelo (Figura 25). Centrifugou-se a 9000 rpm por 30 min a 4°C. Descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o *pellet* em tampão PBS. A suspensão foi dialisada em membranas de 12,4 kDa (Sigma-Aldrich) em tampão PBS a 4°C com trocas do tampão a cada 12 h durante 3 dias. Analisou-se o teor de IgG total e proteína total.

#### 2.4.4. Gel filtração

A purificação do soro de colostro foi testado em coluna de gel filtração contendo a resina Sephacryl S100-HR (GE Healthcare) que fraciona proteínas com peso molecular entre 1 a 100 kDa. Para a montagem da coluna primeiramente calculou-se o volume da suspensão do gel (SBV) através da fórmula:

$$\text{Volume de empacotamento (PBV)} = \pi \times (d / 2)^2 \times \text{altura do leito}$$

$$\text{PBV} = 3,14 \times (1,58 \text{ cm} / 2)^2 \times 15 \text{ cm} = \mathbf{29,4 \text{ cm}^3 \text{ ou } 29,4 \text{ mL}}$$

$$\text{Volume da suspensão do gel (SBV)} = 100 \times \frac{\text{PBV}}{(100\% - \% \text{ compressão})}$$

Considerou-se a % de compressão = 50%, dessa forma:

$$\text{SBV} = 100 \times \frac{29,4 \text{ mL}}{(100\% - 50\%)} = \mathbf{58,8 \text{ mL}}$$

A montagem da coluna foi realizada colocando-se 58,8 mL da suspensão de resina em uma proveta, deixando-se decantar por 24 h. O sobrenadante foi descartado. Fixou-se a coluna em suporte universal e preencheu-se a parte inferior com lã de vidro. Ressuspendeu-se a resina em tampão PBS, e procedeu-se o preenchimento da coluna. O volume da coluna foi empacotada a 15 cm de altura (Figura 26). Lavou-se com tampão PBS. O cálculo do volume de amostra foi feito considerando 2% de amostra em relação ao volume da coluna (leito):

$$\begin{aligned} 29,4 \text{ mL} &- 100\% \\ x &- 2\% \\ \mathbf{x} &= \mathbf{0,588 \text{ mL}} \end{aligned}$$

Uma alíquota de 0,588 mL da amostra foi passada em uma coluna contendo a resina Sephacryl S100 HR. Desprezou-se 7 mL do volume inicial (volume morto), o qual corresponde ao volume ocupado pela fase móvel dentro da coluna. Adicionou-se 40 mL de tampão PBS e recuperaram-se 30 frações de 1 mL. A lavagem da coluna foi feita com tampão PBS, solução de NaOH 0,2M e água ultrapura (Milli-Q). A absorbância das frações foi determinada pela leitura da densidade óptica a 280 nm em cubeta de quartzo. A análise de IgG total e proteína total foi realizada nas frações que apresentaram a maior absorbância.



FIGURA 26 – SISTEMA DE GEL FILTRAÇÃO COM SEPHACRYL S100 HR

## 2.5. Determinação da proteína total

A concentração de proteína total do soro de colostro e das frações purificadas foi determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951). Os ensaios foram realizados em microplacas de 96 poços. Preparou-se 2 soluções: A -  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% (p/v) +  $\text{NaOH}$  0,1N – e B –  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  1% (p/v) +  $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  2% (p/v) na proporção de 1:1. Na reação 20  $\mu\text{L}$  de amostra reagiram com 200  $\mu\text{L}$  da solução A+B (50:1) por 10 min na ausência da luz. Posteriormente, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu (Sigma Aldrich) diluído 1:1, deixando-se reagir por 30 min na ausência da luz. Após a reação, a absorbância foi determinada a 750 nm. Para a construção da curva padrão foram utilizadas concentrações entre 0 a 1 g/L de albumina de soro bovino (BSA), conforme a Figura 27.

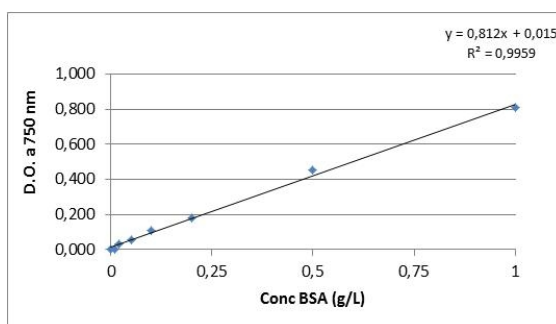


FIGURA 27 – CURVA PADRÃO PARA A DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNA TOTAL

## 2.6. Análise estatística

Os dados foram analisados pela técnica da ANOVA a fim de identificar diferenças entre as amostras ao nível de 5% de significância. A comparação de médias foi realizada pelo teste de Tukey.

## 2.7. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O grau de purificação das proteínas de cada tratamento foi analisado em eletroforese vertical em gel de poliacrilamida, utilizando o sistema da Bio-Rad. A metodologia foi baseada em Laemmli (1970). Amostras foram diluídas até a quantidade de 5 µg em tampão da amostra com beta-mercaptoetanol (reduzidor). As condições de corrida foram a 100 V, 0,015 A por aproximadamente 2 h. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* 1% por 24 h e descorado até o aparecimento das bandas.

## 3. Resultados e Discussão

Neste capítulo foram estudadas 4 estratégias de purificação das imunoglobulinas G, onde foram determinados os rendimentos em massa de IgG e proteína total. Os resultados são discutidos a seguir.

### 3.1. Quantificação das IgGs

Os resultados da análise de 18 amostras de colostro bovino são apresentados na Tabela 21. De acordo com os resultados da Tabela 21 as maiores concentrações de IgG são observadas na primeira ordenha, tendo um decréscimo da concentração na segunda e terceira ordenha, respectivamente. Foi relatado também por outros autores que a concentração de imunoglobulinas no colostro é maior após o parto quando comparado às ordenhas posteriores (OYENIYI; HUNTER, 1978).

TABELA 21 – CONCENTRAÇÃO DE IGG TOTAL EM AMOSTRAS DE COLOSTRO BOVINO

<b>Amostra</b>	<b>Concentração IgG (g/L)</b>
<b>1ª ordenha (n=6)</b>	
322	87,90± 1,82
480	149,81± 1,82
449	96,93± 3,65
296	105,95± 5,47
544	112,40± 3,65
208	108,53± 5,47
<b>Média</b>	<b>110,25 ± 21,30</b>
<b>2ª ordenha (n=6)</b>	
360	53,07± 3,65
208	78,87± 3,65
336	54,36± 1,82
605	7,82 ± 0,91
527	80,16± 1,82
398	46,62± 1,82
<b>Média</b>	<b>65,22 ± 15,43</b>
<b>3ª ordenha (n=6)</b>	
480	37,59± 3,65
336	38,88± 1,82
527	36,30± 1,82
88	44,04± 1,82
505	27,27± 3,65
399	41,46± 1,82
<b>Média</b>	<b>37,59± 5,77</b>

As concentrações médias de IgGs deste trabalho (37,59-110,25 g/L) foram próximas às relatadas por Levieux e Ollier (1999), onde a concentração de IgGs de colostros de vacas mestiças holandesas foi de 49,3 a 85,7 g/L. Resultados de amostras da terceira ordenha foram similares aos encontrados por Muller e Ellinger (1981) (41,2 g/L) e Pritchett *et al.* (1991) (48,2 g/L).

A concentração média de IgG das amostras da primeira ordenha (110,25 g/L) foi próxima aos valores relatados por Filho *et al.* (2001), onde a média da concentração IgGs de vacas mestiças Holandesas-Zebu foi de 145,94 ± 38,75 g/L.

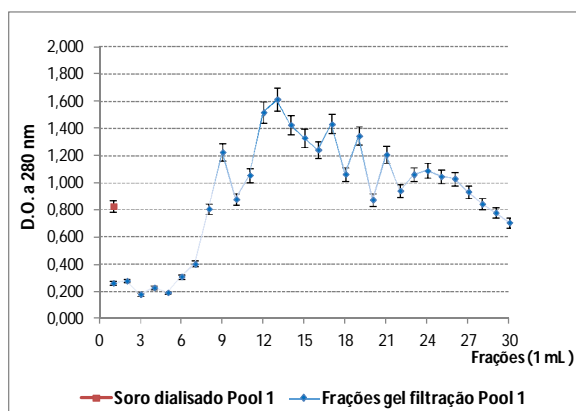
Segundo Godden (2008), o colostro bovino de alta qualidade contém concentração maior do que 50 g/L de IgG. Logo, *pools* de colostro de primeira e segunda ordenha poderiam ser utilizados já que apresentaram altas concentrações de IgG (110,25 e 65,22 g/L respectivamente) implicando em produtos de alta qualidade em termos de IgG bovina.

A técnica RID de quantificação de IgGs já vem sendo largamente adotada por vários autores (MULLER; ELLINGER, 1981; AL-MASHIKHI; NAKAI, 1987; LEVIEUX;

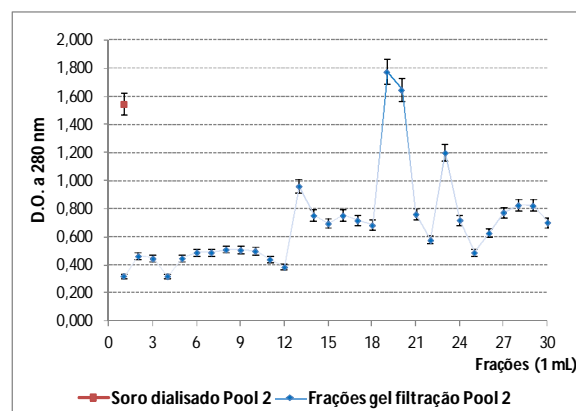
OLLIER, 1999). No entanto, a sua reprodutibilidade pode ser limitada por variações decorrentes do tipo de amostra e manipulação incorreta. Além disso, existe a possibilidade de se encontrar valores superestimados no teste RID. Kummer *et al.* (1992) compararam a quantificação de IgG de leite bovino por ELISA duplo sanduíche e RID e verificaram quantidades inferiores no primeiro método, o qual poderia ser justificado pela presença de constituintes interferentes na matrix láctea. A finalidade desse estudo foi estimar a concentração de IgGs no colostro, a fim de direcionar a sua aplicação em outros produtos. O uso de técnicas imunológicas como o ELISA requer antígenos específicos. Nesse estudo, o uso dessa técnica não seria viável, pois os bovinos não foram previamente imunizados, e produziram, portanto, IgGs totais estimuladas por antígenos específicos, os quais não poderiam ser integralmente determinados devido a sua diversidade.

### 3.2. Análise das frações da gel filtração

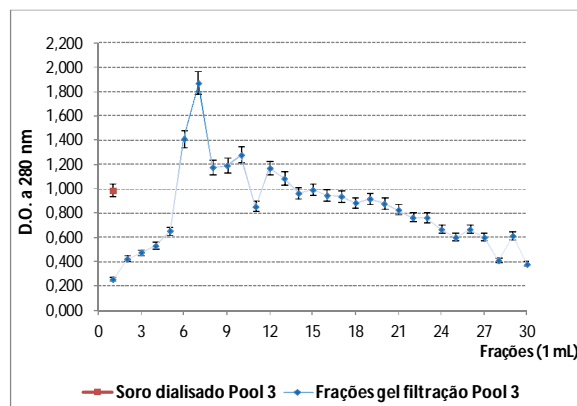
As amostras de soro de colostro dos 3 *pools* foram passadas na coluna de gel filtração e resultaram em 30 alíquotas de 1 mL, as quais apresentaram valores de densidade óptica, conforme a Figura 28.



(a)



(b)



(c)

FIGURA 28 – LEITURA DA ABSORBÂNCIA DAS AMOSTRAS DE SORO DE COLOSTRO PASSADAS EM COLUNA DE GEL FILTRAÇÃO. (a) FRAÇÕES *POOL* 1, (b) FRAÇÕES *POOL* 2 e (c) FRAÇÕES *POOL* 3.

Através dos gráficos (a), (b) e (c) (Figura 28) foi possível observar diferentes perfis de absorbância das amostras de soro purificadas em coluna de gel filtração. No *Pool* 1, a amostra de soro não tratada (soro dialisado) apresentou absorbância de  $0,829 \pm 0,041$ . Após a passagem pela coluna, foram observados valores superiores ( $0,876 \pm 0,043$  a  $1,615 \pm 0,081$ ) nas frações 9 a 21. Já o soro dialisado do *Pool* 2 apresentou um alto valor de absorbância ( $1,548 \pm 0,077$ ), sendo que as frações purificadas apresentaram os maiores valores nas frações 19 a 23 ( $0,579 \pm 0,029$  a  $1,777 \pm 0,089$ ). No *Pool* 3, os maiores valores foram observados nas frações 6 a 12 ( $0,857 \pm 0,043$  a  $1,874 \pm 0,094$ ), e o soro dialisado (não tratado) apresentou valor de  $0,990 \pm 0,050$ . Os maiores valores de absorbância de cada *Pool* foram então selecionados para análise do rendimento em gramas de IgG e grau de purificação. Para o *Pool* 1 foi usada a fração 13 (D.O. =  $1,615 \pm 0,081$ ), para o *Pool* 2 foi usada a fração 19 (D.O. =  $1,777 \pm 0,089$ ), e já para o *Pool* 3 foi usada a fração 7 (D.O. =  $1,874 \pm 0,094$ ).

### 3.3. Análise dos processos de purificação

Primeiramente foi avaliado o rendimento da amostra do *Pool* 1, que estimou a recuperação da massa (g) de proteína e IgG e as perdas (%) em cada etapa do processo de purificação. Os resultados são mostrados na Tabela 22.



TABELA 22 – PERDAS NAS ETAPAS DE PURIFICAÇÃO DO COLOSTRO

Tratamento	Massa Proteína Total (g)	%	Perdas (%)	Massa IgG (g)	%	Perdas (%)
<i>Colostro total</i>	556,85 ± 27,13	100,00	0,00	383,12 ± 5,76	100	0,00
<i>Desnatamento</i>						
Colostro desnatado	413,91 ± 22,80	74,33	25,67	264,72 ± 11,93	69,10	30,90
Gordura	44,04 ± 2,06	7,91	92,09	15,30 ± 2,15	3,99	96,01
Sedimento celular	41,74 ± 1,10	7,50	92,50	21,76 ± 5,14	5,68	94,32
<i>Coagulação</i>						
Soro de colostro	287,95 ± 20,18	51,71	48,29	197,89 ± 1,51	51,65	48,35
Caseína	176,99 ± 3,96	31,78	68,22	63,12 ± 12,59	16,47	83,53
<i>Diálise</i>						
Soro dialisado	266,18 ± 1,05	47,80	52,20	213,64 ± 22,23	55,76	44,24
<i>Microfiltração (0,22µm)</i>						
Retentado	268,96 ± 3,67	48,30	51,70	182,07 ± 4,89	47,47	52,53
Filtrado	29,36 ± 4,72	5,27	94,73	14,49 ± 1,85	3,78	96,22
<i>Ultrafiltração (300 kDa)</i>						
Retentado	26,61 ± 0,56	4,78	95,22	11,30 ± 2,32	2,95	97,05
Filtrado	3,69 ± 0,15	0,89	99,11	0,00 ± 0,00	0,00	100,00
<i>Ultrafiltração (100 kDa)</i>						
Retentado	1,41 ± 0,03	3,20	96,80	0,00 ± 0,00	0,00	100,00
Filtrado	1,58 ± 0,11	3,78	96,22	0,00 ± 0,00	0,00	100,00
<i>Filtração em carvão 141S 6x12</i>						
Filtrado	241,49 ± 19,92	43,70	56,63	220,40 ± 9,34	57,53	42,47
Eluído	30,37 ± 2,79	5,45	94,55	20,82 ± 4,36	5,43	94,57

**Continuação**

<b>Tratamento</b>	<b>Massa Proteína Total (g)</b>	<b>%</b>	<b>Perdas (%)</b>	<b>Massa IgG (g)</b>	<b>%</b>	<b>Perdas (%)</b>
<i>Precipitação com sulfato de amônio</i>						
Suspensão	71,04 ± 4,20	12,76	87,24	76,97 ± 20,26	20,09	79,91
<i>Gel filtração</i>						
Filtrado	103,15 ± 4,29	18,52	81,48	17,30 ± 2,41	4,51	95,49

Como esperado, todos os tratamentos testados levaram a uma diminuição nos teores de proteína total e IgG. Observou-se que etapa de desnatamento do colostro (remoção da gordura) removeu 25,67% do teor inicial de proteínas, sendo ainda mais significativa na diminuição do conteúdo das IgGs (aproximadamente 31%). Esse resultado foi superior ao encontrado por Elfstrand *et al.* (2002) onde a remoção da camada lipídica removeu 23% das IgGs.

Da mesma forma, a etapa de coagulação reduziu o teor de proteínas totais e IgGs em aproximadamente 48%, o que representou a remoção da fração protéica predominante no leite e colostro, representada pela caseína. Elfstrand *et al.* (2002) relataram uma redução de 20% apenas para imunoglobulina IgG1 após a coagulação do colostro. Segundo esses autores, a perda de imunoglobulinas poderia estar relacionada a uma interação com os glóbulos de gordura ou ao aprisionamento das Igs na matrix de caseína, ou ainda, a uma clivagem por enzimas proteolíticas. A minimização dessa perda poderia ocorrer através de estudos de otimização dos processos de desnatamento e coagulação.

A diálise foi realizada a fim de se remover a fração de açúcares (lactose) do soro, considerando que foi utilizada uma membrana de 12,4 kDa de porosidade maior que as moléculas de lactose (0,34 kDa). Após a etapa de diálise, não foi verificada uma perda nas proteínas totais e IgGs.

O soro de colostro foi então passado em membrana de diâmetro 0,22 µm (microfiltração), sendo recuperadas as frações do retentado e filtrado. Quando essas frações foram analisadas observou-se pouca alteração no teor de IgG e proteína total em relação a etapa anterior. Também foi verificado que apenas 3,78% das IgGs passaram pela membrana (filtrado). Essa técnica poderia ser eficiente na recuperação das IgGs já que elas se

mantiveram na fração do retentado, sendo eliminadas as proteínas menores que 0,22  $\mu$ m na fração filtrada. Notou-se uma maior viscosidade do líquido retido na membrana de 0,22  $\mu$ m devido a remoção de água do soro.

Quando a fração do filtrado em 0,22  $\mu$ m foi passada na membrana de 300 kDa, verificou-se que todo o conteúdo de IgG ficou retido na fração do retentado. Uma pequena fração (0,89%) de proteínas menores que 300 kDa passaram pela membrana. As IgGs possuem peso molecular entre 150 e 190 kDa, no entanto, foi constatado que o uso de uma membrana de 300 kDa não permitiu a passagem das IgGs. Uma hipótese que poderia justificar este fato está relacionada a estrutura das imunoglobulinas G de colostro bovino. Segundo o estudo realizado por Porto *et al.* (2007) no colostro bovino existem moléculas de imunoglobulinas G O-glicosiladas, as quais foram mais resistentes a digestão por pepsina em relação às moléculas não glicosiladas. A estrutura dessas IgGs O-glicosiladas pode ter dificultado a passagem dessas proteínas pelos poros da membrana de 0,22  $\mu$ m e 300 kDa.

Esse fato foi também verificado por Bottomley (1993), que estudou duas técnicas para a obtenção de uma rica fração em imunoglobulinas a partir de soro de leite. Nesse estudo, o uso de membranas de 500 kDa permitiu a passagem de somente 4,5% de imunoglobulinas, sendo que, 88% permaneceu no retentado.

Quando o filtrado de 300 kDa foi passado na membrana de 100 kDa, observaram-se proteínas menores no filtrado (3,78%). Em contrapartida, não foi observado teores de IgG tanto no retentado como no filtrado.

O tratamento do soro de colostro utilizando carvão ativado 141S 6 x12 ocasionou a perda de 56,63% de proteínas totais, sendo que parte das proteínas (5,45%) foram posteriormente recuperadas em água destilada. Já a perda do conteúdo de IgGs foi menor (42,47%) em relação a proteína total, podendo revelar uma menor afinidade dessas proteínas pela coluna de carvão.

Já a precipitação com solução saturada de sulfato de amônio e a gel filtração foram os métodos menos eficientes, e ocasionaram a uma grande perda das IgGs (79,91% e 95,49%, respectivamente).

Logo, a fim de se estimar o rendimento em IgG utilizando os 4 métodos testados, elaborou-se o balanço de massa (Figura 29) a partir de 10 litros de colostro bovino.

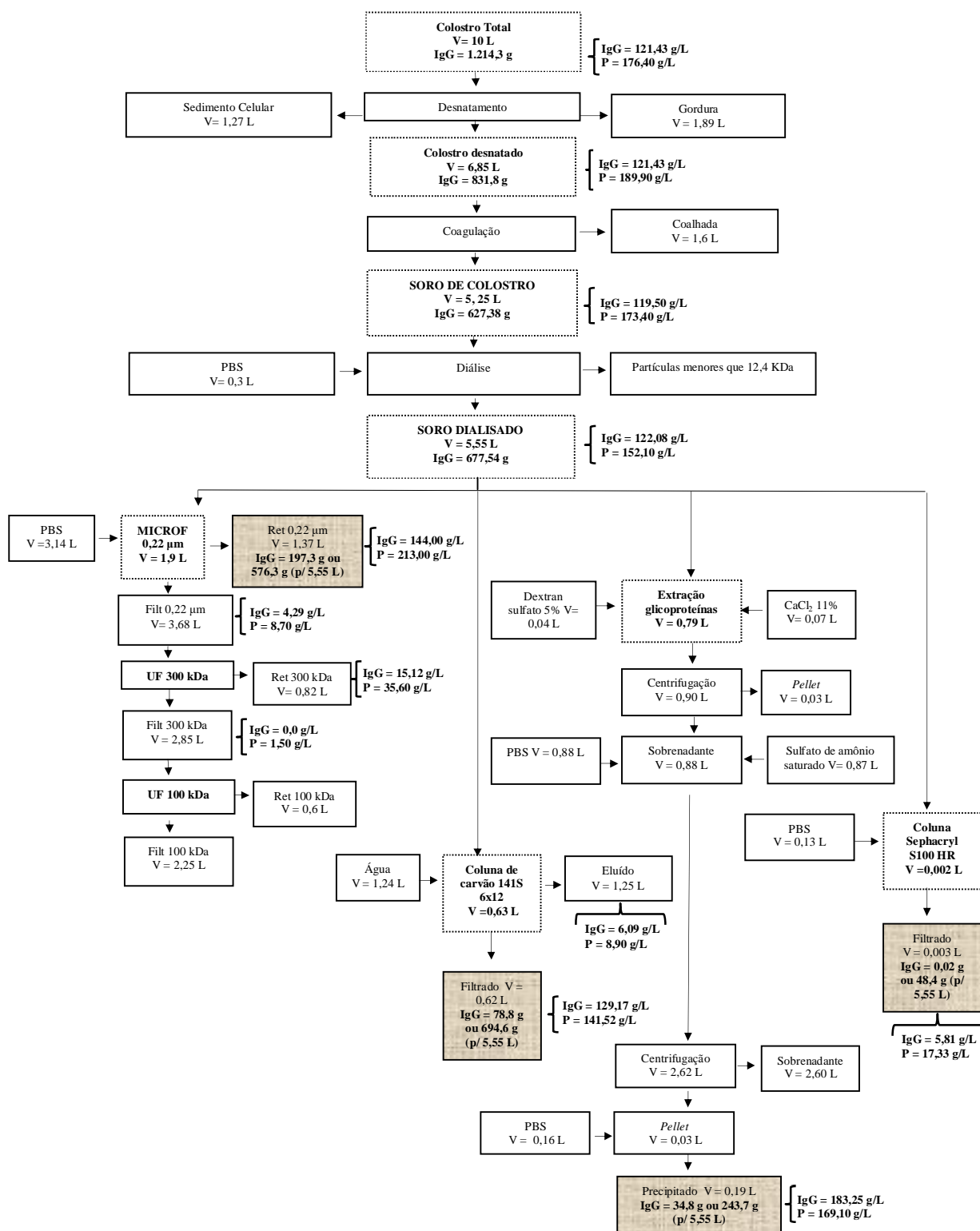


FIGURA 29 – BALANÇO DE MASSA DO RENDIMENTO DA IGG (POOL 1). Legenda: IgG = imunoglobulina G; P = proteína total; V = volume; PBS = tampão fosfato salino; MICROF = microfiltração; Ret = fração do retentado; Filt = fração do filtrado; UF = ultrafiltração.

Os 4 tratamentos testados apresentaram diferentes rendimentos em relação ao teor de IgG presente no colostro (*Pool 1*). O *pool* de colostro apresentou concentração inicial de 121,43 g/L, o que representou 1.214,3 g em 10 litros de colostro. As etapas de desnatamento e coagulação, que foram essenciais a primeira etapa de purificação (pré-tratamento), levaram a uma redução de 48,3%, ou seja, 627,4g de IgGs. Já a etapa de diálise, provocou um incremento de 8% na massa de IgG total em relação a etapa de coagulação, resultando em uma massa de 677,5g de IgG.

Comparando-se o rendimento de cada processo observou-se que os melhores rendimentos de IgG foram observados no retentado de 0,22  $\mu$ m (576,3g) e filtrado em coluna de carvão (694,6g), o que representaram 45,5% e 57,2% respectivamente. O rendimento a partir do retentado de 0,22  $\mu$ m é inferior ao obtido por Piot *et al.* (2004), onde a microfiltração em membrana de 0,1  $\mu$ m seguido pelo retentado recuperado da etapa de ultrafiltração em membrana de 100 kDa resultaram na recuperação de 64% das IgGs. Possivelmente, uma melhor efetividade do processo de filtração, com auxílio de um gradiente de pressão, por exemplo, poderia aumentar o rendimento obtido neste estudo.

Já processos como a precipitação com sulfato de amônio e gel filtração apresentaram baixos rendimentos resultando na recuperação de aproximadamente 20% e 4% de IgG (243,7g e 48,4g, respectivamente). Van Oss (1982) utilizou a gel filtração para o isolamento de imunoglobulinas e alcançou um rendimento de 90%. Al Mashikhi e Nakai (1987) obtiveram rendimentos ainda superiores a este (99% de IgG) utilizando a precipitação por sulfato de amônio e cromatografia em coluna de Sephacryl S-300.

A fim de se avaliar a reprodutibilidade dos processos todos os tratamentos foram testados em 3 *pools* de colostro bovino, cuja composição já foi citada no item 2.4.1. Os resultados de cada processo são mostrados na Tabela 23.

Os resultados dos 3 *pools* foram analisados pela técnica da ANOVA (Análise de Variância) a nível de 5% de significância objetivando avaliar a reprodutibilidade dos processos.

TABELA 23 – COMPARAÇÃO DO RENDIMENTO DE DIFERENTES TÉCNICAS DE PURIFICAÇÃO ENTRE DIFERENTES GRUPOS DE AMOSTRAS

Tratamento	Pool 1		Pool 2		Pool 3	
	Proteína total (g)	IgG total (g)	Proteína total (g)	IgG total (g)	Proteína total (g)	IgG total (g)
Soro dialisado	266,16 ± 1,08	213,64 ± 22,23	427,04 ± 15,01	228,16 ± 25,52	87,95 ± 3,65	57,10 ± 6,26
Microfiltração 0,22 µm (retentado)	267,38 ± 3,67	182,07 ± 4,89	431,57 ± 2,94	145,54 ± 20,88	70,34 ± 2,37	49,20 ± 0,00
Filtração em carvão 141S 6 x 12	247,67 ± 20,42	220,4 ± 19,85	175,4 ± 1,42	53,94 ± 15,39	24,53 ± 3,33	10,94 ± 2,40
Precipitação com sulfato de amônio	71,04 ± 4,20	76,97 ± 20,26	118,68 ± 5,76	79,13 ± 16,83	11,42 ± 0,43	9,50 ± 0,90
Gel filtração	103,15 ± 4,29	17,30 ± 2,41	56,10 ± 6,49	16,04 ± 2,41	71,35 ± 1,96	5,47 ± 1,71

Avaliou-se, primeiramente a variável IgG do *Pool 1* comparando-se o soro dialisado (S) com as frações purificadas através dos outros tratamentos: retentado da filtração em membrana de 0,22 µm (R), filtrado em carvão 141S 6 x 12 (F), precipitado com sulfato de amônio (P) e fração gel filtrada (G). O tratamento S foi selecionado para efeito de comparação já que representa a primeira etapa de purificação da amostra. A comparação foi realizada a fim de avaliar a viabilidade de métodos subsequentes de purificação.

TABELA 24 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - *Pool 1*

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	4	130657	32664	122,93	< 0,001
Resíduos	15	3986	266		
Total	19	134643			

De acordo com a análise (Tabela 24), o soro dialisado (S) não apresentou diferença significativa em relação a R e F (Figura 30). Já o soro em comparação a P e G apresentou diferença significativa a nível de 5%. R apresentou diferença em relação a F, P e G. Apesar de R e F não apresentarem diferença em relação a S, F demonstrou uma maior similaridade a amostra pré-purificada (S) (Figura 31).

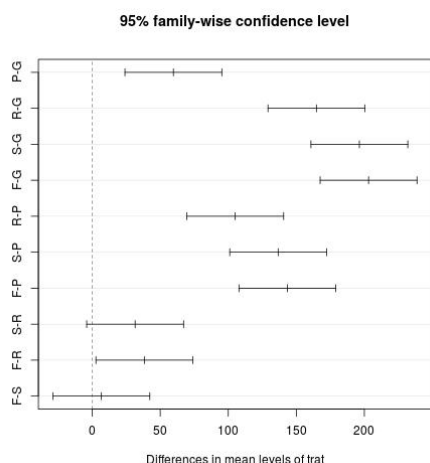


FIGURA 30 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL IGG – *POOL 1*

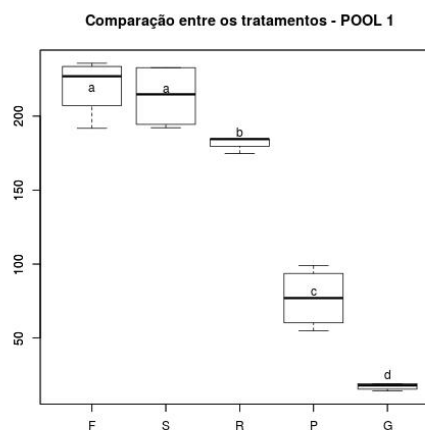


FIGURA 31 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL IGG – *POOL 1*

No *Pool 2* verificou-se diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 25). S apresentou diferença em relação a R, F, P e G (Figura 32). Comparando-se os tratamentos, observou-se que F não apresentou diferença significativa em relação a P e G, porém P e G apresentaram diferença entre si (Figura 33).

TABELA 25 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - *Pool 2*

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	4	112007	28002	86,789	< 0,001
Resíduos	15	4840	323		
Total	19	116847			

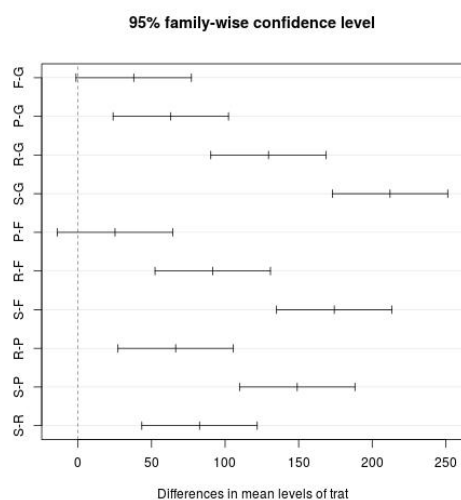


FIGURA 32 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL IGG – POOL 2

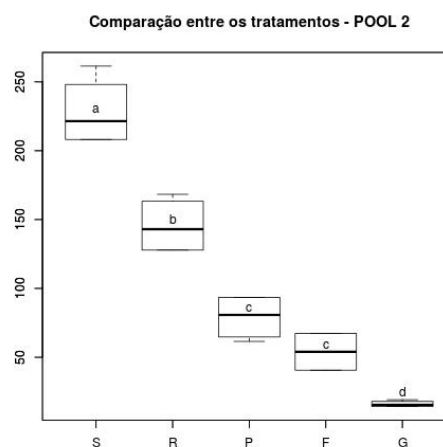


FIGURA 33 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL IGG – POOL 2

No *Pool 3* foi observada diferença significativa entre os tratamentos (Tabela 26). O tratamento S não apresentou diferença significativa em relação ao R. Já com relação a G, F e P houve diferença significativa a nível de 5% (Figura 34). O tratamento P não apresentou diferença em relação ao tratamento F (Figura 35).

TABELA 26 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - *Pool 3*

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	4	11,702	2,78	123,1	< 0,001
Resíduos	15	0,337	0,02		
Total	19	12,039			



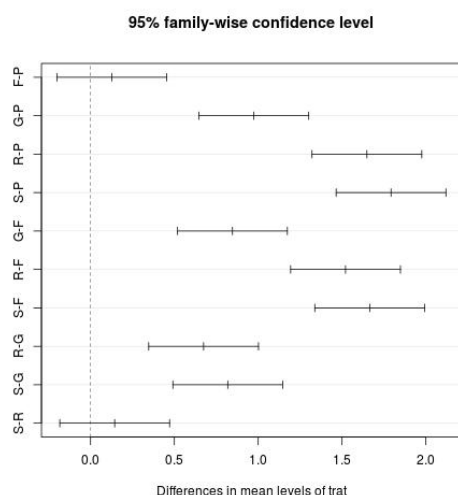


FIGURA 34 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL IGG – *POOL 3*

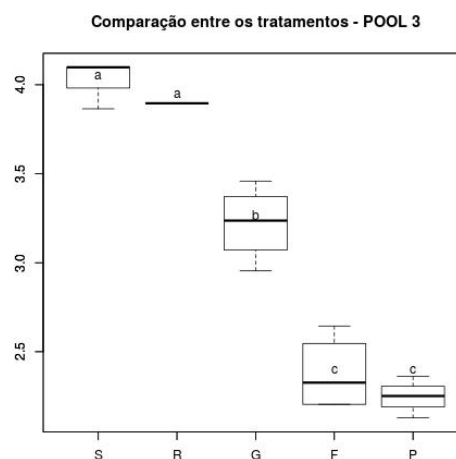


FIGURA 35 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL IGG – *POOL 3*

Analisando os 3 *pools* concluiu-se que o tratamento R foi o melhor tratamento aplicado ao soro dialisado (S), já que não foi verificada diferença significativa entre S e R no *Pool 1* e 3. Já no *Pool 2* o tratamento R foi o que apresentou a menor diferença em relação a S. As diferenças nos resultados dos *Pools 1, 2* e 3 pode ser justificada pela composição das amostras utilizadas para a confecção dos *pools*. A seleção ocorreu em função da disponibilidade das amostras.

A análise dos resultados de proteína total para o *Pool 1* mostraram diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 27).

TABELA 27 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - *Pool 1*

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	4	7,823	1,956	783,2	< 0,001
Resíduos	10	0,025	0,00		
Total	14	7,848			

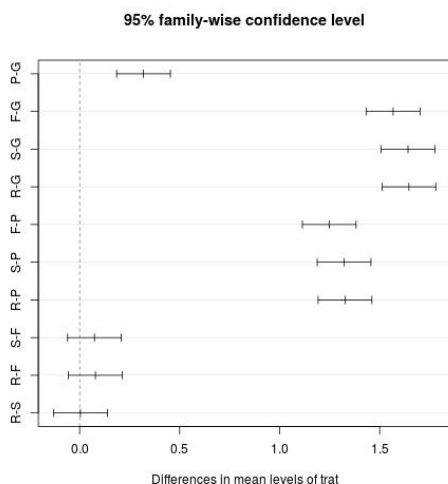


FIGURA 36 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL – *POOL 1*

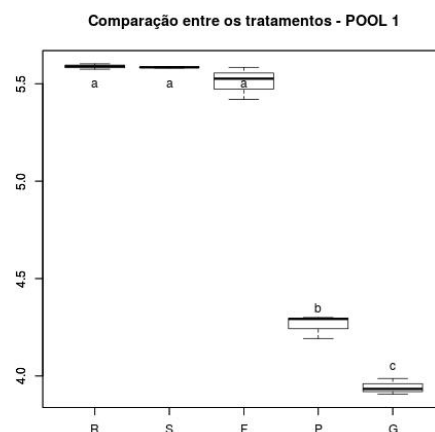


FIGURA 37 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL – *POOL 1*

Como observado para a variável IgG, a variável proteína total não apresentou diferença entre o tratamento S e os tratamentos R e F, os quais também não diferiram entre si (Figura 36). Ambos os tratamentos S, R e F foram significativamente diferentes de P e G (Figura 37).

No *Pool 2* foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (Tabela 28). O tratamento S não apresentou diferença em relação a R (Figura 38), diferente do que foi observado anteriormente para a variável IgG. Já em comparação com os tratamentos F, P e G, o tratamento S apresentou diferença significativa (Figura 39).

TABELA 28 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - *Pool 2*

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	4	406266	101566	1816,2	< 0,001
Resíduos	10	0559	56		
Total	14	406827			

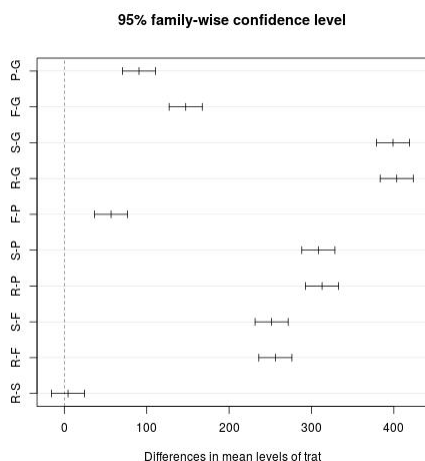


FIGURA 38 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL- *POOL 2*

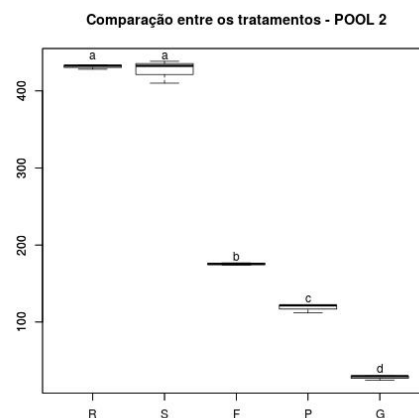


FIGURA 39 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL -*POOL 2*

No *Pool 3* os tratamentos apresentaram diferenças significativas a nível de 5% (Tabela 29). Todos os tratamentos diferiram entre si. Dessa forma, o soro dialisado apresentou diferença em relação aos tratamentos R, F, P e G (Figura 40 e 41).

TABELA 29 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - *Pool 3*

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	4	12345	3086	494,23	< 0,001
Resíduos	10	0624	6,24		
Total	14	12969			

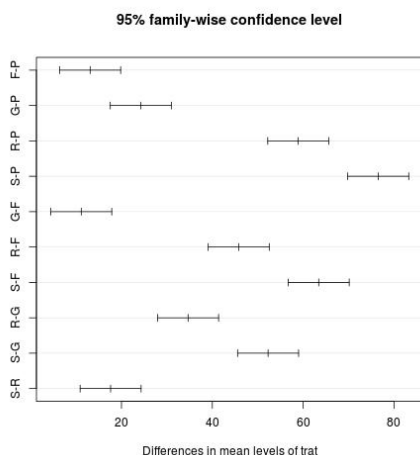


FIGURA 40- DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS, VARIÁVEL VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL- *POOL 3*

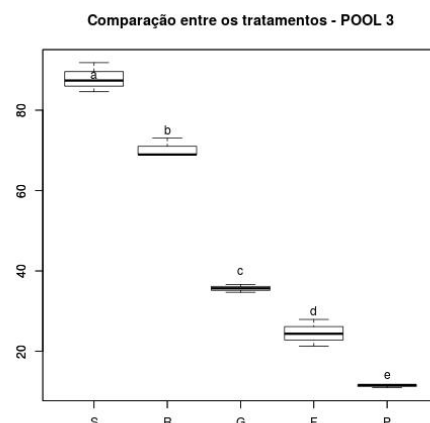


FIGURA 41- COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PELA TÉCNICA DE BOX PLOT, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL-*POOL 3*

Através dos resultados foi possível concluir que o tratamento R foi o melhor tratamento para recuperação da proteína total, já que não apresentou diferença em relação ao tratamento S nos *Pools 1* e *2*. Em relação ao *Pool 3*, o soro dialisado foi diferente do tratamento R, porém este tratamento apresentou os valores mais próximos de S quando comparado aos tratamentos G, F e P.

O objetivo dessa análise foi avaliar a reprodutibilidade dos processos e definir qual dos tratamentos foi mais efetivo para a recuperação das IgGs. Avaliando o rendimento obtido de IgG (g) e proteína total (g) concluiu-se que o tratamento R (retentado de 0,22  $\mu$ m) foi o que apresentou o melhor rendimento em comparação ao tratamento S (soro dialisado), sendo este (R) selecionado para a elaboração do produto de colostro.

### 3.3.1. Grau de purificação dos diferentes tratamentos

O colostro total, o soro de colostro dialisado e as frações purificadas foram submetidas a eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Figura 42) a fim de verificar o grau de purificação das amostras. O padrão foi o da marca Rainbow (GE Healthcare), no qual cada cor representou os diferentes pesos moleculares: azul (250 kDa), vermelho (160 kDa), verde (105 kDa), amarelo (75 kDa), roxo (50 kDa), azul (35 kDa), laranja (30 kDa), verde (25 kDa), azul (15 kDa) e vermelho (10 kDa). As amostras sofreram

redução com beta-mercaptoetanol a fim de hidrolisar a molécula de IgG em 2 moléculas de 25 kDa e 2 moléculas de 50 kDa.

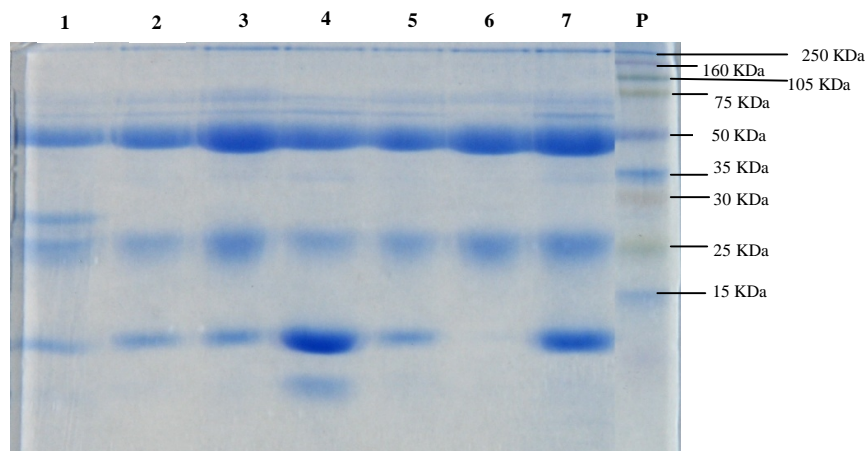


FIGURA 42 – ELETROFORESE SDS-PAGE DO COLOSTRO TOTAL E FRAÇÕES PURIFICADAS (*POOL* 1). Legenda: (1) colostro total; (2) soro de colostro dialisado; (3) fração do retentado em membrana de 0,22 µm; (4) fração do filtrado em membrana de 0,22 µm; (5) filtrado em carvão ativado 141S 6x12; (6) precipitado por sulfato de amônio; (7) fração 13 gel filtração; (P) padrão de peso molecular.

De acordo com Figura 42 foi observado que perfil do colostro total (1) foi semelhante ao das amostras tratadas (2-7). O soro dialisado (2), a fração do retentado de 0,22 µm (3), o filtrado em carvão (5) e o filtrado em coluna de gel filtração (7) apresentaram perfis bem semelhantes com destaque de 3 bandas principais (50, 25 e abaixo de 15 kDa).

Foi observado que a etapa de produção do soro de colostro dialisado removeu uma banda entre 30 e 25 kDa. Já na fração do filtrado em membrana de 0,22 µm foi verificada a presença de uma banda não visualizada nas outras amostras, de peso molecular abaixo de 15 kDa. Essa banda poderia ser atribuída a proteínas menores como a  $\alpha$ -lactoalbumina com peso de 14,175 kDa (BREW *et al.*, 1970), que estariam em maior concentração nessa fração, ou resíduos de aminoácidos decorrentes do processo de redução com beta-mercaptoetanol. A precipitação com sulfato de amônio removeu bandas abaixo de 15 kDa, demonstrando a recuperação das bandas de 25 e 50 kDa as quais compõem a molécula de IgG. No entanto, como já foi mostrado anteriormente o rendimento alcançado por essa técnica foi mais baixo (20%) comparado às outras técnicas testadas.

#### 4. Conclusões

As amostras de colostro bovino apresentaram uma boa concentração em IgG (maior que 50 g/L), demonstrando potencial para aplicação em produtos funcionais e/ou nutracêuticos.

Os processos de purificação do colostro levaram a reduções nos teores de proteínas e IgGs. Dentre as técnicas aplicadas nesse estudo o maior rendimento em IgGs foi alcançado pela filtração em coluna de carvão (57,2%) e com o uso de membranas de 0,22 µm, recuperando-se a fração do retentado (45,5%). O uso da precipitação por sulfato de amônio e da gel filtração (Sephacryl S100-HR) resultaram em baixos rendimentos 20% e 4,5% de IgG, respectivamente. No entanto, avaliando-se a reprodutibilidade dos processos em 3 *pools* de colostro verificou-se que o retentado da filtração em membrana de 0,22 µm foi o único que não apresentou diferença significativa em relação ao soro de colostro pré purificado (soro dialisado), sendo este tratamento selecionado para a elaboração do produto.

Com relação ao grau de purificação, verificou-se uma similaridade do colostro não tratado às amostras de colostro tratadas/purificadas, as quais apresentaram perfis eletroforéticos muito próximos. Todos os tratamentos levaram a recuperação das bandas de 25 e 50 kDa, as quais compõem a molécula de IgG. Apenas a técnica de precipitação por sulfato de amônio removeu as bandas abaixo de 15 kDa.

#### Referências

- AL-MASHIKHI, S. A.; NAKAI, S. Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel filtration techniques. **Journal of Dairy Science**, v. 70, p. 2486-2492, 1987.
- ARCHAMBAULT, D. *et al.* Immune response of pregnant heifers and cows to bovine rotavirus inoculation and passive protection to rotavirus infection in newborn calves fed colostral antibodies or colostral lymphocytes. **American Journal of Veterinary Research**, v. 49, p. 1084–1091, 1988.
- BOBE, G. *et al.* Separation and quantification of bovine milk proteins by Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 458-463, 1998.
- BOTTOMLEY, R. C. **Isolation of an immunoglobulin rich fraction from whey**. United States Patent 5194591, Mar. 16, 1993.
- BRANDON, M. R.; LASCELLES, A. K. Relative efficiency of absorption of IgG1, IgG2, IgA and IgM in the newborn calf. **Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science**, v. 49, p. 629-633, 1971.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Regulamento da inspeção industrial e sanitária de produtos de origem animal(RIISPOA). Título VIII: **Inspeção industrial e sanitária do leite e derivados**. Capítulo I – Leite em natureza. Disponível em: < [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/Aniamal/MercadoInterno/Requisitos/RegulamentoInspecaoIndustrial.pdf) >. Acesso: 14/01/2013.

- BREW, K. *et al.* The complete amino acid sequence of bovine  $\alpha$ -lactalbumin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 10, p. 4570–4582, 1970.
- BRINKWORTH, G. D.; BUCKLEY, J. D. Concentrated bovine colostrum protein supplementation reduces the incidence of self-reported symptoms of upper respiratory tract infection in adult males. **European Journal of Nutrition**, v. 42, p. 228-232, 2003.
- CHRISTIANSEN, S.; GUO, M.; KJELDEN, D. Chemical composition and nutrient profile of low molecular weight fraction of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 630-636, 2010.
- COCKRUM, R. **Composition and method for modulating immune responsiveness**. United States Patent 0198688 A1, Oct. 23, 2003.
- DAVISON, G.; DIMENT, B. C. Bovine colostrum supplementation attenuates the decrease of salivary lysozyme and enhances the recovery of neutrophil function after prolonged exercise. **British Journal of Nutrition**, v. 103, p. 1425-1432, 2010.
- DOAN, T. *et al.* Moléculas da imunidade adaptativa. In: \_\_\_\_\_. **Imunologia Ilustrada**. Porto Alegre, RS: Artmed, 2008. pp. 59.
- DOSKA, S. Biological functional components in cow's milk. **The Japanese Society for Food Science and Technology**, v. 41, p. 523–528, 1994.
- EBINA, T. *et al.* Prevention of rotavirus infection by oral administration of cow colostrum containing antihuman rotavirus antibody. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 174, 177-185, 1985.
- ELFSTRAND, L. *et al.* Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 879-887, 2002.
- ETZEL, L. R.; STROHBEHN, R. E.; MCVICKER, J. K. Development of an automated turbidimetric immunoassay for quantification of bovine serum immunoglobulin G. **American Journal of Veterinary Research**, v. 58, p. 1201–1205, 1997.
- FILHO, P. M. S. *et al.* Concentrações de imunoglobulinas G em colostro de vacas mestiças Holandês-Zebu. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1033-1037, 2001.
- FLEENOR, W.A.; STOTT, G.H. Single radial immunodiffusion analysis for quantitation of colostrum immunoglobulin concentration. **Journal of Dairy Science**, v. 64, p. 740-747, 1981.
- GAPPER, L. W. *et al.* Analysis of bovine immunoglobulin G in milk, colostrum and dietary supplements: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 389, p. 93–109, 2007.
- GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, p. 19-39, 2008.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos que utilizam o gradiente de pressão como força motriz. In: \_\_\_\_\_. **Processos de Separação por Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006. pp. 103-108.
- HAMMARSTRÖM, L. *et al.* Systemic and topical immunoglobulin treatment in immunocompromised patients. **Immunological Reviews**, v. 139, p. 43-70, 1994.
- HE, F. *et al.* Modulation of human humoral immune response through orally administered bovine colostrum. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 31, p. 93–96, 2001.
- HENG, G. B. Chemical composition of bovine colostrum. In: WHITAKER, J. R. *et al.* (eds). **Food for Health in the Pacific Rim**. Trumbull, USA: Food and Nutrition Press, 1999. pp. 405-411.
- HILPERT, H. *et al.* Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 156, 158-166, 1987.

- HODGINS, D. C.; SHEWEN, P. E. Preparturient vaccination to enhance passive-immunity to the capsular polysaccharide of *Pasteurella Haemolytica* A1. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 50, p. 67-77, 1996.
- HURLEY, W. L. Immunoglobulins in mammary secretions. In: FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. (eds.). **Advanced Dairy Chemistry: proteins**, vol. 1, 3 ed. New York, NY, USA: Kluwer Academic, 2003. pp. 421-447.
- JOHNSON, J. *et al.* The effect of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of cellular and humoral immune parameters in neonatal dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, p. 5189-5198, 2007.
- JONES, P. W.; COLLINS P.; AITKIN, M. M. Passive protection of calves against experimental infection with *Salmonella typhimurium*. **The Veterinary Record**, v. 123, n. 21, p. 536-541, 1988.
- KELLY, K. S. Bovine colostrum: a review of clinical uses. **Alternative Medicine Review**, v. 8, p. 378-394, 2003.
- KIM, J. H. *et al.* Health-promoting effects of bovine colostrum in Type 2 diabetic patients can reduce blood glucose, cholesterol, triglyceride and ketones. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.20, p. 298-303, 2009.
- KORHONEN, H. Isolations of immunoglobulins from colostrum. **IDF Bulletin**, v. 389, p. 78-81, 2004.
- KUMMER, A. *et al.* Quantification of bovine IgG in milk using enzyme-linked immunosorbent assay. **Food and Agricultural Immunology**, v. 4, p. 93-102, 1992.
- KOTHE, K. N. *et al.* **Method of preparing a solution of lactic or colostric immunoglobulins or both and use thereof**. United States Patent 4,644,056, Feb. 17, 1987.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAMBIN, P.; BURSTEIN, M. Isolation of a beta 2-glycoprotein from human serum after precipitation with dextran sulfate and manganese chloride. **Biochemie**, v. 64, p. 1065-1071, 1982.
- LARSON, B. L. Immunoglobulins of the mammary secretions. In: FOX, P. F. (ed). **Advanced Dairy Chemistry: 1, proteins**. 2 ed. London:Elsevier, 1992. pp. 231-254.
- LARSON, B. L.; HEARY, H. L. Jr.; DEVERY, J. E. Immunoglobulin production and transport by the mammary gland. **Journal of Dairy Science**, v. 63, p. 665-671, 1980.
- LEVIEUX, D. Quantification of IgG in cows' milk by semiautomatic radial immunodiffusion for the detection of colostrum, mastitic milk or the end of gestation. I: development of the assay. **Lait**, v. 71 p. 327-337, 1991.
- LEVIEUX, D.; OLLIER, A. Bovine immunoglobulin G,  $\beta$ -lactoglobulin,  $\alpha$ -lactalbumin and serum albumin in colostrum and milk during the early post partum period. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 421-430, 1999.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-276, 1951.
- MADUREIRA, A. R. *et al.* Bovine whey proteins: overview on their main biological properties. **Food Research International**, v. 40, p. 1197-1211, 2007.
- MAMILA, P. *et al.* Prevention and suppression of *Helicobacter felis* infection in mice using colostrum preparation with specific antibodies. **Helicobacter**, v. 8, p. 192-201, 2003.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A.O.; HEREMSANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v.2, p.235-254, 1965.



MARNILA, P.; KORHONEN, H. Immunoglobulins. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. (eds). **Encyclopedia of Dairy Sciences**. London, UK: Academic Press, 2002, pp. 1950-1956.

MAUNSELL F. P. *et al.* Effects of mastitis on the volume and composition of colostrum produced by Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 81, p. 1291–1299, 1998.

MEHRA, R.; MARNILA, P.; KORHONEN, H. Milk immunoglobulins for health promotion. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1262-1271, 2006.

MOORE, M. *et al.* Effect of delayed colostrum collection on colostral IgG concentration in dairy cows. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, p.1375–1377, 2005.

MULLER, L. D.; ELLINGER, D. K. Colostral immunoglobulin concentrations among breeds of dairy cattle. **Journal Dairy of Science**, v. 64, p. 1727-1730, 1981.

MULVIHILL, D. M.; DONOVAN, M. Whey proteins and their thermal denaturation: a review. **Irish Journal of Food Science and Technology**, v. 11, p. 43–75, 1987.

MYERS, L. L.; SNODGRASS, D. R. Colostral and milk antibody titers in cows vaccinated with a modified live rotavirus-coronavirus vaccine. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 181, p. 486–488, 1982.

NEWBY, T. J.; STOKES, C.R.; BOURNE, F. J. Immunological activities of milk. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 3, p. 67–94, 1982.

NARDONE, A. *et al.* Composition of colostrum from dairy heifers exposed to high air temperatures during late pregnancy and the early postpartum period. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 838–844, 1997.

OONA, M. *et al.* Helicobacter pylori in children with abdominal complaints: Has immune bovine colostrum some influence on gastritis? **Alpe Adria Microbiology Journal**, v. 6, p. 49–57, 1997.

OYENIYI, O. O.; HUNTER, A. G. Colostral constituents including immunoglobulins in the first three milkings postpartum. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p.44-48, 1978.

PFEIFFER N. E. *et al.* Quantitation of bovine immunoglobulins: comparison of single radial immunodiffusion, zinc sulphate turbidity, serum electrophoresis, and refractometer methods. **American Journal of Veterinary Research**, v. 38, p. 693–698, 1977.

PIOT, M. *et al.* Preparation of serocolostrum by membrane microfiltration. **Lait**, v. 84, p. 333–341, 2004.

PORTO, A.C.R.C. *et al.* Isolation of bovine immunoglobulins resistant to peptic digestion: new perspectives in the prevention of failure in passive immunization of neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 2, p. 955-962, 2007.

PRITCHETT, L.C. *et al.* Management and production factors influencing immunoglobulin G1 concentration in colostrum from Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 74, p. 2336-2341, 1991.

RAYMOND, G. *et al.* **Process for the separation of immunoglobulins from colostrum**. United States Patent 4582580, Apr. 15, 1986.

SGARBIERI, V. C. Propriedades fisiológicas funcionais das proteínas do soro do leite. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, p. 397-409, 2004.

STANFIELD, R. L. *et al.* Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 Å. **Science**, v. 248, p. 712-719, 1990.

STEPHEN, A. J. *et al.* **Production of an immunoglobulin enriched fraction from whey protein solutions**. United States Patent 6592905, July 15, 2003.

STOTT, G. H.; LUCAS, D. O. **Immunologically active whey fraction and recovery process**. United States Patent, 4,834,974, May 30, 1989.

SHIMAZAKI, Y. *et al.* Passive immunization with milk produced from an immunized cow prevents oral recolonization by *Streptococcus mutans*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 8, p. 1136–1139, 2001.

TACKET, C. O. *et al.* Efficacy of bovine milk immunoglobulin concentrate in preventing illness after *Shigella flexneri* challenge. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 276–83, 1992.

THOMAS, R. L. *et al.* Selective enrichment of proteins using formed in- place membranes. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 1002–1005, 1992.

TYLER, J. W. *et al.* Colostral immunoglobulin concentrations in Holstein and Guernsey cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 60, p. 1136–1139, 1999.

TZIPORI, S.; ROBERTSON, D.; CHAPMAN, C. Remission of diarrhoea due to cryptosporidiosis in an immunodeficient child treated with hyperimmune bovine colostrum. **British Medical Journal**, v. 293, p. 1276–1277, 1986.

VAN OSS, C. J. Isolation and characterization of immunoglobulins. **Separation and Purification Reviews**, v. 11, p. 131–176, 1982.

WALTNER-TOEWS, D. *et al.* A field trial to evaluate the efficacy of a combined rotavirus-coronavirus *Escherichia coli* vaccine in dairy cattle. **Canadian Journal of Comparative Medicine**, v. 49, p. 1–9, 1985.

WEINER, C. *et al.* Passive immunity against human pathogens using bovine antibodies. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 116, p. 193–205, 1999.

## CAPÍTULO 4

### ESTABILIZAÇÃO E FORMULAÇÃO DE PRODUTO A BASE DE IMUNOGLOBULINA G DE COLOSTRO BOVINO

Patente: **Colostro bovino e /ou caprino como ingrediente funcional em produtos lácteos fermentados**. Inventores: Soccol, C. R.; Yamaguishi, C. T. Número INPI: PI 1102588-3. Maio/2011.

#### 1. Introdução

A produção de alimentos funcionais e nutracêuticos é uma tendência crescente na atualidade, apresentando um bom potencial de mercado destinado a públicos alvos específicos. Os alimentos funcionais são reconhecidos por trazerem benefícios ao consumidor através da melhora das condições de saúde e redução do risco de algumas doenças. Outras definições descrevem os alimentos funcionais como alimentos aparentemente similares aos alimentos convencionais consumidos como parte da dieta, porém que tenham sofrido alguma modificação a fim de oferecer funções fisiológicas além de providenciar a nutrição básica (ROBERFROID, 1999). O termo alimento nutracêutico foi introduzido por Stephen DeFelice em 1989 e refere-se a alimentos ou partes de alimentos que fornecem benefícios médicos ou à saúde e podem atuar na prevenção e tratamento de doenças (VASCONCELOS, 2010). Segundo a regulamentação da ANVISA (BRASIL, 1999) para que se possa alegar a propriedade funcional de um alimento ou ingrediente, o mesmo deve apresentar, além das funções nutricionais básicas, efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica. Esses efeitos podem estar associados ao crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999).

Já o conceito de suplementos nutricionais está relacionado a substâncias que ajudam o organismo a alcançar um bom desempenho ou providenciam um bom estado fisiológico após um problema de saúde (AHMADI-VINCULI; AHMADI; AHMADI, 2005). Entre alguns exemplos de suplementos nutricionais estão aminoácidos, androstenediona e dehidroepiandrosterona (DHEA), cafeína, carnitina, a coenzima Q10 (Ubiquinona), colostro,

creatinina, ginseng, glutamina, triglicerídios de cadeia média, piruvato, ribose, bicarbonato de sódio entre outros (INSEL; TURNER; ROSS, 2004).

Geralmente, o custo dos alimentos funcionais é maior chegando a custar 30 a 50% a mais que os alimentos tradicionais (LINDNER *et al.*, 2013). Além disso, o desenvolvimento desses produtos está condicionado a comprovação da sua funcionalidade e da superação de algumas limitações como a perda da funcionalidade durante o processamento, estocagem, comercialização e consumo, incompatibilidade com a matriz alimentícia, produção de aroma e sabor indesejáveis e controle da textura. Apesar desses obstáculos, a produção desses tipos de alimentos ainda mostra-se vantajosa, desde que, o consumo possa ser incorporado a dieta diária, de forma a prevenir o aparecimento de certas doenças e melhorar as funções fisiológicas do organismo.

O mercado brasileiro de alimentos industrializados fortificados e funcionais é bastante promissor considerando seu crescimento expressivo ao longo dos anos. Segundo dados do Euromonitor Internacional, essa classe de alimentos apresentou um aumento no faturamento de US\$ 5 bilhões em 2007 para US\$ 9,8 bilhões em 2012 (DANIELLS, 2013).

Neste estudo, desenvolveu-se um produto a base de colostro bovino, visto que ele apresenta um potencial biológico para o mercado de alimentos funcionais e/ou nutracêuticos, podendo ainda, ser utilizado como suplemento alimentar. Considerando a fração significativa das imunoglobulinas G (6%) no colostro bovino (FOLEY; OTTERBY, 1978) e os estudos que reforçam a idéia da administração dessa proteína, foi proposta uma formulação de produto em pó contendo uma alta composição em Imunoglobulina G bovina.

### 1.1. Produtos a base de imunoglobulina G de colostro bovino

Sabe-se que as imunoglobulinas derivadas do leite e do colostro já vêm sendo utilizadas em suplementos infantis e outros alimentos (MEHRA; MARNILA; KORHONEN, 2006). Alguns autores relataram que a atividade imunológica de IgG bovina de vacas imunizadas contra específicos patógenos de origem humana foram similares a IgGs de leite humano (FACON; SKURA; NAKAI, 1993; MEHRA; MARNILA; KORHONEN, 2006).

Os produtos de colostro que contêm as imunoglobulinas são geralmente provenientes de bovinos imunizados ou não. Leites provenientes de bovinos não imunizados apresentaram anticorpos contra patógenos de origem humana como rotavírus (YOLKEN *et al.*, 1985), *E. coli*, *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* e *Shigella flexneri* (LOSSO *et al.*, 1993).

As operações gerais para o processamento do colostro são a coleta, desnatamento, pasteurização e secagem em condições que mantenham a sua atividade biológica. Os produtos estão disponíveis na forma de pós liofilizados ou secos em spray dryer e soro de colostro líquido filtrado ou concentrado. Dentro dos produtos secos estão incluídos pós de colostro, pós desnatados, concentrado de proteína de colostro desnatado e concentrado de soro de colostro (MEHRA; MARNILA; KORHONEN 2006). A Tabela 30 lista alguns produtos de colostro descritos na literatura. As imunoglobulinas podem ser também incorporadas nas formulações de alimentos vendidos em sachês, cápsulas, tabletes de mascar e soro de colostro líquido.

Existem poucas formulações a base de colostro bovino que são comercializadas na Austrália, Estados Unidos e Alemanha (MEHRA; MARNILA; KORHONEN, 2006). Algumas das funções conferidas pelo uso destas formulações são a ação imunopotencializadora, suplemento para aumentar o desempenho atlético e auxílio na prevenção da diarreia viral em pacientes infantis e imunodeprimidos. No Brasil estas formulações ainda não foram desenvolvidas com eficácia, provavelmente porque a obtenção dos componentes bioativos e funcionais do colostro envolvem grandes desafios em termos de processamento e estabilidade.

TABELA 30 – PRODUTOS DE COLOSTRO COMERCIALIZADOS

<b>Produto</b>	<b>Empresa</b>	<b>Benefícios</b>
Intact™	Numico RA (Australia)	Melhora da imunidade e performance atlética
Gastrogard- R™	Northfield Laboratories, (Australia)	Prevenção da diarreia causada por rotavírus em crianças menores de 4 anos
PRO-IMMUNE 99	GalaGen Inc. (USA)	Prevenção da diarreia causada por <i>E. coli</i> em bezerros
Proventra™ natural immune components		Estimula a imunidade e melhora a resistência natural do corpo
Lactimmunoglobulin Biotest	Biotest Pharm GmbH (Germany)	Produto usado em tratamento de diarreia humana em pacientes com AIDS
Colostrum Gold™ Liquid - Flavored	Kirkman® (USA)	Manutenção do sistema imune e fornece fatores de crescimento
ColostruMune™ powder	Sterling Technology, Inc (USA)	Manutenção do sistema imune
First Defence®	Immucell (USA)	Reduz a mortalidade e a morbidade de diarreias causadas por <i>E. coli</i> e coronavírus em bezerros
Immulox®	APS BioGroup (USA)	Regula o sistema imune

FONTE: Adaptado de PAKKANEN e AALTO (1997), SCAMMELL (2001) e COLOSTRUM EUROPE (2013).

Vários estudos tem relatado a eficácia da administração oral de formulações contendo anticorpos. Frações enriquecidas com imunoglobulinas provenientes de vacas imunizadas com microrganismos enteropatógenos de origem humana têm apresentado um efeito protetor em humanos (FACON; SKURA; NAKAI, 1993). Além disso, foi demonstrado em estudos *in vitro* que a IgG bovina é relativamente resistente a proteólise por enzimas humanas digestivas, e não é inativada pelo ácido gástrico (DE RHAM; ISLIKER, 1977; McCLEAD; GREGORY, 1984). A administração oral de concentrados de imunoglobulinas bovinas resultou na recuperação de 10% de IgGs vírus neutralizante detectadas em fezes de crianças que receberam essa suplementação (HILPERT *et al.*, 1987). No estudo de Roos *et al.* (1995) uma preparação a base de imunoglobulina de colostro bovino (Lactobin<sup>®</sup>) foi marcada com o isótopo <sup>15</sup>N e administrada em voluntários adultos. Após 8 horas de ingestão, foi constatado que 19% das IgGs e 19% das IgM permaneceram biologicamente ativas no íleo, demonstrando resistência gástrica das imunoglobulinas. Da mesma forma, Kelly *et al.* (1997) estudaram a permanência da imunoglobulina G após a passagem pelo trato gastrointestinal de adultos saudáveis. Esses autores avaliaram diferentes formas de administração de um concentrado contendo anticorpos (IgG) contra toxina de *Clostridium difficile*. Os indivíduos ingeriram o concentrado em jejum, juntamente com a refeição, junto com antiácido, durante o tratamento com omeprazol e em cápsulas. Foi verificada uma maior recuperação das IgGs (32,7%) nas fezes, quando o concentrado foi ingerido em cápsulas. Também foi observada a manutenção da atividade antitoxina neutralizante.

A administração oral de imunoglobulinas de colostro e leite de vacas imunizadas providenciou uma proteção efetiva contra infecções causadas por *E. coli* enterotoxigênica (TACKET *et al.*, 1988; MIETENS, KEINHORST, 1989) e *Cryptosporidium* spp. (PLETTENBERG *et al.*, 1993) em crianças e adultos. Também foi demonstrado que a ingestão oral do colostro bovino contendo anticorpos contra rotavírus humano foi efetivo na prevenção da infecção por rotavírus em animais e crianças (DAVIDSON, 1996).

Todas essas investigações reforçam a idéia que o colostro tem potencial para ser utilizado como suplemento imunológico em formulações infantis e outros alimentos hiperimunes (LO; KLEIMAN, 1996), sendo que, várias formulações já foram registradas em patentes (KOTHE *et al.*, 1987; ANDERSON *et al.*, 1998; COCKRUM, 2003; BAG, 2007).

## 1.2. Estudos de estabilidade da IgG

O consumo do colostro *in natura* pode representar uma fonte de organismos infecciosos como *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*, conhecido como Map (STREETER *et al.*, 1995); *Mycoplasma* spp. (WALZ *et al.*, 1997); *Escherichia coli* (STEELE *et al.*, 1997), *Salmonella* spp. (STEELE *et al.*, 1997); *Listeria monocytogenes* (FARBER; SANDERS; MALCOLM, 1988; STEELE *et al.*, 1997) e *Campylobacter* spp. (LOVETT; FRANCIS; HUNT, 1983; STEELE *et al.*, 1997). Como medida de controle para eliminar os microrganismos patogênicos do colostro têm-se sugerido o uso da pasteurização.

Godden *et al.* (2006) demonstraram que a pasteurização do colostro a 60°C por 30 min foi suficiente para a eliminação de microrganismos como *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis* e *M. bovis*.

Alguns relatos da literatura têm mostrado o efeito da temperatura na concentração de imunoglobulinas G e características físicas do colostro bovino (LI-CHAN *et al.*, 1995; DOMINGUEZ; PEREZ; CALVO, 1997; GODDEN *et al.*, 2006; McMARTIN *et al.*, 2006). Têm sido observado que a pasteurização poderia levar a uma alteração na viscosidade do colostro (McMARTIN *et al.*, 2006) e desnaturação das imunoglobulinas (LI-CHAN *et al.*, 1994; GODDEN *et al.*, 2003).

A recuperação das imunoglobulinas pode variar conforme o tratamento utilizado. Tratamentos térmicos para a redução da microflora presente no leite e colostro, por exemplo, influenciaram a atividade biológica das imunoglobulinas. Segundo Mainer *et al.* (1999) a inativação das IgGs começou a temperaturas maiores que 65°C e a 81°C, sendo que, a atividade vírus neutralizante contra o rotavírus foi perdida em menos de 2 min. Tratamentos a 72°C por 15 segundos resultaram em perdas de 10 a 30% na atividade das IgGs (LI-CHAN *et al.*, 1995). Tratamentos UHT (138°C durante 4 segundos) podem resultar na inativação total das IgGs (KUMMER *et al.*, 1992).

Contudo, alguns estudos revelaram que a sensibilidade ao calor parece ser dependente da espécie. Diferenças na sensibilidade térmica das IgGs bovina, caprina e ovina (LAW, 1995) e entre isótopos de imunoglobulina G, A e M bovina foram observados (MAINER *et al.*, 1997). Foi constatado que a termoestabilidade da IgG é maior que da IgA, e ambos são mais estáveis que a IgM.

Técnicas quantitativas vêm sendo empregadas no estudo da estabilidade térmica das imunoglobulinas e se baseiam em métodos cromatográficos (RESMINI *et al.*, 1989), calorimetria diferencial de varredura (*Differential Scanning Calorimetry*) (LINDSTRÖM *et*

*al.*, 1994), e métodos imunológicos (LI-CHAN *et al.*, 1995). Esses métodos estimam os parâmetros cinéticos e termodinâmicos do processo de desnaturação. Especificamente, os métodos imunológicos medem o grau de desnaturação pela perda da imunoreatividade das imunoglobulinas, ocasionada por alterações na região antígeno ligante. A aplicação desse método, no entanto, requer o uso de anticorpos específicos às imunoglobulinas a serem testadas.

Diversos estudos têm sido realizados a fim de assegurar a manutenção da atividade biológica das IgGs de leite ou colostro bovino. Tais estudos avaliaram a estabilidade das IgGs a condições de estresse ao calor, pH e pressão durante etapas de purificação, processamento e estocagem (LI-CHAN *et al.*, 1995; CHEN; TU; CHANG, 2000; ANDO *et al.*, 2005; LI; BOMSER; ZHANG, 2005; OHNUKI; OTANI, 2005; CAO; WANG; ZHENG, 2007). A estabilidade das imunoglobulinas de colostro bovino ao processo de secagem também foi avaliada (CHELACK; MORLEY; HAINES, 1993; KLOBASA; GOEL; WERHAHN, 1998) bem como o uso de protetores (CHEN; CHANG, 1998; CHEN; TU; CHANG, 2000).

### 1.3. Uso de exopolissacarídeos como lioprotetores

Polissacarídeos são biopolímeros produzidos por animais, plantas, fungos e bactérias. Já exopolissacarídeos (EPS) são polímeros excretados para o meio extracelular. Os EPS são polissacarídeos de cadeias longas com ramificações que consistem de repetidas unidades de açúcar e seus derivados.

A produção de EPS por bactérias já têm sido largamente descrita devido a sua variabilidade estrutural, a qual oferece diversas propriedades físico-químicas e biológicas. Algumas das funções conferidas aos EPS bacterianos são ocultar a superfície bacteriana, auxiliar na aderência a outras superfícies bacterianas ou ao substrato, proteção contra condições ambientais, atua como estrutura estabilizadora em biofilmes e como molécula de sinalização (BADEL; BERNARDI; MICHAUD, 2011). No entanto, a elucidação dos efeitos fisiológicos são ainda pouco conhecidos e apenas alguns deles como a goma xantana, gelana e curculana são empregadas na indústria de alimentos (SURESH KUMAR; MODY; JHA, 2007; SUTHERLAND, 2007).

O grupo de bactérias lácticas excreta EPS de alto peso molecular, geralmente heteropolissacarídeos (composto por vários tipos de monossacarídeos), que apresentam propriedades físicas e reológicas de interesse para a indústria como agentes estabilizadores, gelificadores, emulsificadores ou melhoradores da viscosidade (WANG *et al.*, 2008).



Polissacarídeos de *Lactobacillus* sp. têm demonstrado efeitos benéficos à saúde. *Kefiran* é o polissacarídeo produzido pelo *Lactobacillus kefiranofaciens* no interior dos grãos de kefir. Quando esse polissacarídeo foi administrado em ratos numa dose de 100-300mg/kg observou uma redução na pressão sanguínea, colesterol e taxa de glicose no sangue (MAEDA *et al.*, 2004). Outras propriedades desse polissacarídeo também foram relatadas como a atividade anti inflamatória, anti tumoral e estimulação da secreção de imunoglobulinas (RODRIGUES; CARVALHO; SCHEEDORF, 2005; VINDEROLA *et al.*, 2006). Também o EPS produzido por *L. rhamnosus* atuou na melhora da secreção do fator da necrose tumoral (DE VUYST; DE VIN; KAMERLING, 2007).

A secagem por congelamento ou liofilização é um processo largamente utilizado na indústria e consiste em remover a água do produto congelado por sublimação e dessorção sob vácuo (ABDELWAHED *et al.*, 2006). No entanto, o emprego dessa técnica ocasiona estresse às moléculas sensíveis às etapas de congelamento e secagem, já que o congelamento promove uma fase de separação em gelo e solução crio concentrada. Essa solução concentrada pode induzir a uma agregação de partículas e a cristalização do gelo pode levar a danos mecânicos. Por isso, torna-se necessário o uso de crioprotetores (protetores contra o congelamento) ou lioprotetores (protetores contra a secagem). Excipientes comumente usados na indústria farmacêutica são mostrados na Tabela 31.

TABELA 31 – EXCIPIENTES USADOS NA LIOFILIZAÇÃO DE PRODUTOS FARMACÊUTICOS

<b>Tipo</b>	<b>Função</b>	<b>Substância</b>
Agentes espessantes	Providenciar o engrossamento da formulação, especialmente quando a concentração do produto é muito baixa	Hidroxi etil amido, trealose, manitol, lactose e glicina.
Tampões	Ajuste do pH	Fosfato, tris-HCl, citrato e histidina.
Estabilizadores	Proteger o produto durante a liofilização contra o estresse causado pelo congelamento e secagem	Sacarose, lactose, glicose, trealose, glicerol, manitol, sorbitol, glicina, alanina, lisina, polietileno glicol, dextrana e polivinilpirrolidona (PVP).
Reguladores de tonicidade	Produzir uma solução isotônica e controlar a pressão osmótica	Manitol, sacarose, glicina, glicerol e cloreto de sódio.
Modificadores de temperatura de colapso	Aumenta a temperatura de colapso do produto para obter temperaturas mais elevadas de secagem	Dextrana, hidroxipropil- $\beta$ -ciclodextrina, Polietilenoglicol (PEG) e PVP.

FONTE: ABDELWAHED *et al.* (2006).

Neste estudo buscou-se avaliar o uso de um exopolissacarídeo produzido por bactérias lácticas como estabilizador no processo de liofilização do produto, visto que este EPS poderia apresentar um efeito protetor sobre as IgGs e ainda agregar valor ao produto devido ao seu valor biológico (em teste) e nutritivo. Considerando que a efetividade dos excipientes no processo de liofilização é influenciada pela concentração a ser utilizada foram testadas duas concentrações de EPS de 0,5 e 2,5% (p/v).

## 2. Material e Métodos

### 2.1. Coleta e estocagem do colostro

Os procedimentos para a coleta e estocagem foram os mesmos citados no **item 2.1** do **Capítulo 1**.

### 2.2. Produção do soro de colostro

Os procedimentos para a produção do soro de colostro foram os mesmos citados no **item 2.3** do **Capítulo 3**. As amostras de colostro usadas para a elaboração do soro foram provenientes do *Pool 1*, cuja composição foi citada no **item 2.4** do **Capítulo 3**.

### 2.3. Tratamento do soro de colostro

A etapa de diálise e microfiltração do soro em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  foram realizadas conforme já foi mencionado no **item 2.4** e **2.4.1** do **Capítulo 3**. Para a elaboração do produto utilizou-se apenas a fração retida na membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  (denominada como retentado).

### 2.4. Teste de estabilidade a pasteurização

As amostras de soro de colostro (*Pool 1*) foram testadas quanto à estabilidade ao processo de pasteurização. Um volume de 3 mL de soro foram colocados em frascos de vidro e deixados em banho maria a 60°C/45min, 65°C/30 min e 72°C/15s. Após estes períodos os frascos foram resfriados em água fria (5-10°C) e foram realizadas as análises de IgG total e

proteína total. Os resultados foram comparados com a amostra de soro não pasteurizada (controle).

## 2.5. Teste de estabilidade a liofilização

Para a análise da estabilidade a liofilização foram testados os lioprotetores: CMC (carboximetilcelulose) e EPS (exopolissacarídeo de bactéria láctica e levedura liofilizado). O EPS foi produzido no Laboratório de Processos Biotecnológicos da UFPR e o protocolo de produção se encontra em processo de patenteamento. As concentrações testadas para CMC foram 0,5% e 1% (p/v) e para EPS foram 0,5% e 2,5% (p/v). O diluente utilizado foi água destilada estéril. Um volume de 1,5 mL de soro de colostro (*Pool 1*) foi colocado em frascos de vidro. Agitou-se e adicionou-se 1,5 mL de solução com lioprotetor gota a gota por 2-3 min. A mistura foi submetida a um congelamento rápido e foi secada por liofilização. O pó obtido foi ressuscitado em 3 mL de água destilada. Foram determinadas as concentrações de IgG total e proteína total. Os resultados foram comparados com a amostra de soro não liofilizada (controle) e liofilizada e sem adição de lioprotetor (controle L).

## 2.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida

O estudo da estabilidade das IgGs foi avaliada mediante uma eletroforese vertical em gel de poliacrilamida (LAEMMLI, 1970). O sistema utilizado foi o da Bio-Rad. As amostras foram diluídas até a quantidade de 5 µg em tampão da amostra com beta-mercaptoetanol (redutor). As condições de corrida foram a 100V, 0,015A por aproximadamente 2 h. O gel foi corado com Comassie Brilliant Blue 1% por 24 h e descorado até o aparecimento das bandas.

## 2.7. Elaboração do produto

Um volume de 250 mL da fração do retentado (0,22 µm) do *Pool 1* foi misturado a 250 mL de uma solução de EPS 0,5% (p/v) sob constante agitação. A mistura foi pasteurizada a 60°C por 45 min. Após, a mesma foi resfriada e submetida a um congelamento rápido e liofilizada. O cálculo da dose recomendada foi baseada na % de IgG / % de sólidos totais do produto e a quantidade necessária para se obter o efeito desejado.

O cálculo da % de sólidos totais é descrito a seguir:

$$\frac{P1 - P}{V} \times 100$$

Onde:

P1 = peso do frasco vazio + pó

P = peso do frasco vazio

V = volume de soro

## 2.8. Estabilidade ao armazenamento

Estudou-se a estabilidade do produto contendo IgG bovina ao longo do tempo. Amostras do pó foram coletadas no tempo zero (após a liofilização), 15 e 30 dias de armazenamento a temperatura de 20-25°C e na ausência de luz. As amostras foram analisadas quanto ao teor de IgG total.

## 2.9. Quantificação das imunoglobulinas G

A quantificação das imunoglobulinas G totais foi realizada pelo método de Mancini, Carbonara e Heremsans(1985), conforme já mencionado no **item 2.2 do Capítulo 3**.

## 2.10. Determinação da proteína total

O teor de proteína total foi determinado pelo método de Lowry *et al.* (1951), conforma já mencionado no **item 2.5 do Capítulo 3**.

## 2.11. Determinação do açúcares totais

Foi determinado o teor de açúcares totais no produto em pó de acordo com a Dubois *et al.* (1956). Diluiu-se 1 g de pó em 50 mL de água destilada e dessa solução foram feitas sucessivas diluições. Para a reação utilizou-se 0,5 mL da amostra e 0,5 mL do reagente de fenol. Após adicionou-se 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. O branco consistiu de 0,5 mL de água, 0,5 mL de reagente de fenol e 2,5 mL de ácido sulfúrico concentrado. A

densidade óptica foi medida pela leitura da absorbância a 490 nm. Utilizou-se uma curva padrão de glicose com concentrações entre 40 e 200 µg/mL.

## 2.12. Análise estatística

As diferenças entre as amostras foram analisadas pela técnica da ANOVA ao nível de 5% de significância. A comparação entre médias foi realizada utilizando o teste de Tukey.

## 3. Resultados e Discussão

O objetivo desse estudo foi desenvolver um produto a base de IgG de colostro bovino. A manutenção da concentração e atividade biológica da IgG são essenciais para funcionalidade do produto. Nesse contexto, estudou-se a estabilidade da IgG a processos como a pasteurização e secagem por liofilização avaliando também a influência do uso de lioprotetores. Também foi proposta uma formulação do produto a base de IgG bovina e definida uma dose necessária para alcançar os efeitos funcionais/nutracêuticos desejados.

### 3.1. Estabilidade a pasteurização

Os valores de IgG (g) e proteína total (g) após o tratamento térmico são apresentados na Tabela 32. De acordo com a análise (ANOVA) das replicatas e entre os diferentes tratamentos pôde-se observar que não houve diferença significativa no teor de IgG (Tabela 33), indicando que a concentração de IgG não sofreu alteração, bem como sua atividade biológica.

TABELA 32 – RESULTADOS DE IGG E PROTEÍNA TOTAL APÓS O TRATAMENTO TÉRMICO

Tratamento	Proteína total (g)	IgG total (g)
<i>Controle (não pasteurizado)</i>	288,96 ± 10,52	169,95 ± 8,97
60°C/45min	308,24 ± 26,68	188,46 ± 3,02
65°C/30 min	263,07 ± 46,18	162,55 ± 27,97
72°C/15s	294,05 ± 44,70	189,70 ± 4,68

TABELA 33 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - TESTE PASTEURIZAÇÃO

<b>Fator de Variação</b>	<b>Graus Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Teste F</b>	<b>p-valor</b>
Tratamentos	3	1.648,5	549,49	2,5052	0,1333
Resíduos	8	1.754,7	219,34		
Total	11	3.403,2			

Da mesma forma, para proteína total não foi verificada diferença significativa (p-valor = 0,3683) entre as condições usadas na pasteurização (Tabela 34), ressaltando que os binômios tempo/temperatura testados podem ser utilizados sem afetar a concentração das proteínas.

TABELA 34 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - TESTE PASTEURIZAÇÃO

<b>Fator de Variação</b>	<b>Graus Liberdade</b>	<b>Soma dos Quadrados</b>	<b>Quadrado Médio</b>	<b>Teste F</b>	<b>p-valor</b>
Tratamentos	3	3.202,7	1.067,57	1,2054	0,3683
Resíduos	8	7.085,1	885,64		
Total	11	10.287,8			

Esses resultados estão em concordância com Dominguez, Perez e Calvo (1997) que não observaram redução na atividade antígeno-ligante após o tratamento térmico do colostro a 65°C por 30 min. Mainer *et al.* (1999) também não observaram a desnaturação das IgGs em temperaturas abaixo 65°C.

Godden *et al.* (2006) avaliaram 5 bateladas de colostro bovino tratados a 60°C por 120 min e não encontraram diferenças entre o colostro tratado e não tratado. Já a elevação da temperatura a 63°C por 120 min ocasionou uma redução de 40,26% no teor de IgG e um aumento na viscosidade de amostras de colostro pré-tratadas em relação às amostras pós-tratadas (McMARTIN *et al.*, 2006). Em contrapartida a pasteurização de colostro bovino a 63°C por 30 min levou a um leve aumento da viscosidade e uma perda de 23,6% das IgGs (GODDEN *et al.*, 2003). Também, o estudo realizado por McMartin *et al.* (2006) demonstrou que o aquecimento acima de 63°C pode levar a um desdobramento e consequente agregação das IgGs devido a exposição de aminoácidos hidrofóbicos ou que contenham enxofre.

Os resultados deste trabalho diferem dos relatados por Li-Chanet *al.* (1995) onde tratamentos a 72°C por 15 segundos resultaram em perdas de 10 a 30% da atividade das imunoglobulinas. Green, Godden e Feirtag (2003) também testaram a mesma condição de pasteurização e verificaram reduções de 25 a 30% na concentração de imunoglobulinas G de

colostro. Já no estudo de Mainer *et al.* (1997) foi observada uma desnaturação de apenas 1% das IgGs quando estas foram submetidas a 72°C por 15 segundos.

Apesar de não ser constatada uma diferença entre as condições de pasteurização optou-se pelo uso da pasteurização a 60°C por 45 min, tendo em visto a preservação da atividade biológica e relatos da literatura em que houve a preservação da IgG nessas mesmas condições (ELFSTRAND *et al.*, 2002).

### 3.2. Estabilidade a liofilização

A liofilização do soro de colostro sem adição e contendo os lioprotetores CMC e EPS resultou em um pó fino de coloração levemente amarelada, como mostra a Figura 43.

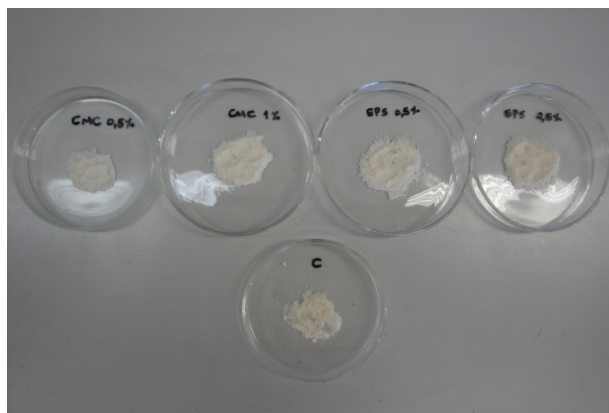


FIGURA 43 – SORO DE COLOSTRO SEM E COM ADIÇÃO DE PROTETORES APÓS A LIOFILIZAÇÃO. LEGENDA: C= controle (sem lioprotetor); CMC 0,5% = soro contendo 0,5% de carboximetilcelulose; CMC 1% = soro contendo 1% de carboximetilcelulose; EPS 0,5% = soro contendo 0,5% de exopolissacarídeo; EPS 2,5% = soro contendo 2,5% de exopolissacarídeo.

Os valores de IgG (g) e proteína total (g) determinados após a adição dos protetores e a liofilização estão apresentados na Tabela 35. O *controle* consistiu na amostra de soro não liofilizada e o *controle L* consistiu na amostra de soro sem adição de lioprotetor liofilizada.

TABELA 35 – RESULTADOS DE IGG E PROTEÍNA TOTAL APÓS A LIOFILIZAÇÃO

Tratamento	Proteína total (g)	IgG total (g)
<i>Controle</i>	288,96 ± 10,52	169,95 ± 8,97
<i>Controle L</i>	262,07 ± 55,12	168,72 ± 5,57
CMC 0,5%	241,49 ± 22,65	132,93 ± 15,30
CMC 1%	238,19 ± 44,87	152,67 ± 8,11
EPS 0,5%	271,74 ± 24,59	199,57 ± 26,77
EPS 2,5%	320,70 ± 18,99	147,74 ± 16,67

NOTA: CMC 0,5% = soro contendo 0,5% de carboximetilcelulose; CMC 1% = soro contendo 1% de carboximetilcelulose; EPS 0,5% = soro contendo 0,5% de exopolissacarídeo; EPS 2,5% = soro contendo 2,5% de exopolissacarídeo.

A análise estatística (ANOVA) mostrou que houve diferença significativa (p-valor = 0,006064) entre as amostras liofilizadas para a variável IgG (Tabela 36). O *controle* e o *controle L* não apresentaram diferenças entre si e também em relação às amostras contendo os lioprotetores CMC (3) e (4) e EPS (5) e (6) (Figura 44). No entanto, o uso do lioprotetor EPS na concentração de 0,5% (5) diferiu significativamente da concentração de 2,5% (6) e também das amostras contendo CMC 0,5% (3) e 1% (4). Para a variável IgG o melhor resultado foi alcançado com o uso do EPS 0,5% (Figura 45).

TABELA 36 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - TESTE LIOFILIZAÇÃO

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	5	7.967,0	1.593,4	5,7796	0,006064
Resíduos	12	3.308,4	275,7		
Total	17	11.275,4			



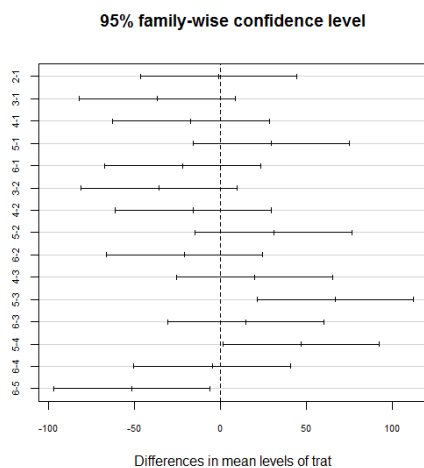


FIGURA 44 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS – TESTE LIOFILIZAÇÃO, VARIÁVEL IGG

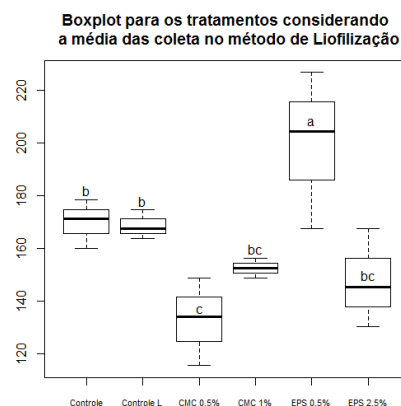


FIGURA 45 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PELA TÉCNICA DE BOX PLOT – TESTE LIOFILIZAÇÃO VARIÁVEL IGG

Analisando as médias dos resultados de proteína total foi verificado que houve diferença significativa ( $p\text{-valor} = 0,03313$ ) entre os tratamentos testados (Tabela 37). Da mesma forma, o *controle* (1) e *controle L* (2) não apresentaram diferenças entre si e em relação às amostras contendo os lioprotetores CMC (3) e (4) e EPS (5) e (6) (Figura 46). A amostra com EPS 2,5% (6) diferiu das amostras com CMC 0,5% (3) e 1% (4) (Figura 47).

TABELA 37 – ANOVA PARA A VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL - TESTE LIOFILIZAÇÃO

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	5	14.458,7	2.891,73	3,5624	0,03313
Resíduos	12	9.740,8	811,74		
Total	17	24.199,5			

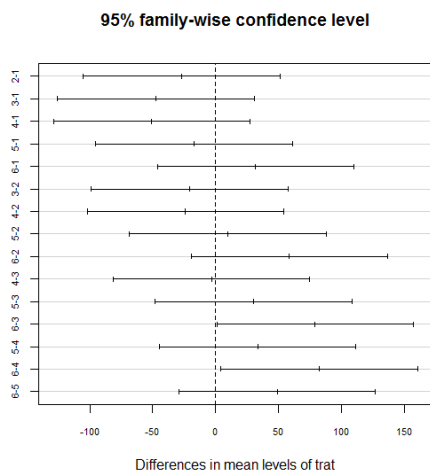


FIGURA 46 - DIFERENÇAS ENTRE OS TRATAMENTOS – TESTE LIOFILIZAÇÃO, VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL

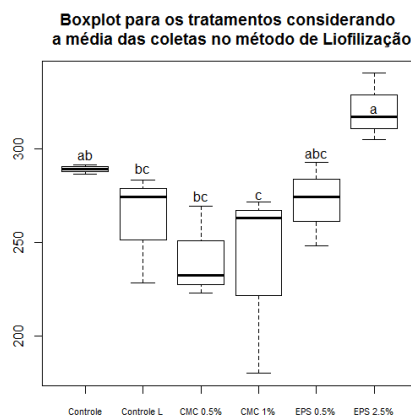


FIGURA 47 – COMPARAÇÃO ENTRE OS TRATAMENTOS PELA TÉCNICA DE BOX PLOT – TESTE LIOFILIZAÇÃO VARIÁVEL PROTEÍNA TOTAL

Avaliando a ação protetora dos dois suportes testados, conclui-se que o uso do EPS foi melhor para a recuperação das IgGs e proteínas totais quando comparado ao uso da CMC. A concentração de EPS 0,5% parece ser mais eficiente para a manutenção da estabilidade das IgGs e a concentração de EPS 2,5 % mostrou-se mais eficiente para a manutenção das proteínas totais.

De uma forma geral, o processo de liofilização, bem como o uso de lioprotetores, não afetou a concentração de IgGs e proteínas totais. No entanto, optou-se por selecionar o uso do EPS 0,5%, visto que este foi similar ao controle e que a incorporação desse suporte (EPS) poderia agregar funcionalidade ao produto já que este apresenta propriedades tecnológicas e nutricionais de interesse para este estudo.

A fim de confirmar a influência dos processos de pasteurização e liofilização sobre a molécula de IgG realizou-se uma eletroforese vertical das proteínas em gel de poliacrilamida. Os perfis eletroforéticos são apresentados na Figura 48.

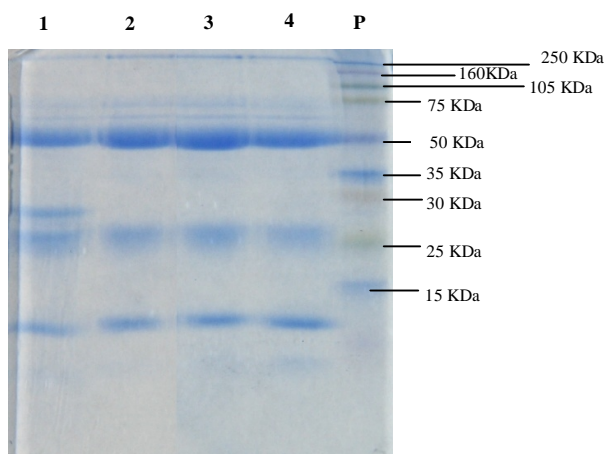


FIGURA 48 – ELETROFORESE SDS-PAGE TESTE DE ESTABILIDADE (*POOL* 1). Legenda: 1 – colostro total; 2 – soro de colostro dialisado; 3 – soro pasteurizado; 4 – soro liofilizado + EPS 1%; P – padrão de peso molecular.

Processos como a pasteurização e liofilização não influenciaram significativamente a composição das proteínas do soro de colostro, como mostra a Figura 48. No soro dialisado (2) são visualizadas 3 bandas principais (50, 25 e abaixo de 15 kDa). Os perfis das amostras (2), (3) e (4) são similares mostrando que a pasteurização e liofilização não afetaram a composição protéica, mantendo as bandas que representaram a molécula de IgG (50 e 25 kDa).

Efstrand *et al.* (2002) estudaram a influência do processo de filtração, pasteurização e secagem por liofilização sobre o conteúdo de IgGs do soro de colostro e obtiveram um rendimento de 75% das imunoglobulinas. Chelack, Morley e Haines (1993) compararam técnicas de desidratação do colostro e verificaram uma perda na atividade biológica das imunoglobulinas de 20% na evaporação a vácuo em microondas, 10% na liofilização e 5% na secagem em *spray dryer*.

Neste estudo não foi verificada diferença entre amostras liofilizadas e não liofilizadas. O mesmo foi constatado por Klobasa, Goel e Werhahn (1998), onde o congelamento e a liofilização não ocasionaram significativas reduções na concentração das imunoglobulinas. No entanto, a discrepância desses resultados com os trabalhos citados anteriormente poderia ser justificada pela limitada confiabilidade do método de determinação de diferentes amostras de colostro, apresentando variações nos resultados que não permitiram detectar diferenças entre a amostra liofilizada e não liofilizada.

### 3.3. Elaboração do produto contendo IgG

Após serem realizados os testes de pasteurização e liofilização elaborou-se o produto (Figura 49), o qual foi baseado na fração do retentado em membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  adicionado de uma solução de EPS 1% (p/v) (1:1).



FIGURA 49 – PRODUTO DE COLOSTRO EM PÓ

A condição de pasteurização selecionada foi de 60°C por 45 min, visto que as condições testadas não apresentaram diferenças e o uso da pasteurização lenta poderia preservar a integridade da molécula de IgG em relação a pasteurização rápida (72°C por 15 s).

Antes e após a liofilização da mistura, determinaram-se as concentrações de IgG total, proteína total e açúcares totais, como mostra a Tabela 38.

TABELA 38 – COMPOSIÇÃO DO PRODUTO CONTENDO IGG BOVINA

Produto	Proteína total	IgG total	Açúcar total
Líquido (g/L)	91,79 $\pm$ 6,08	70,85 $\pm$ 3,35	1,43 $\pm$ 0,01
Pó (g/L)	20,15 $\pm$ 0,52	15,58 $\pm$ 2,15	1,06 $\pm$ 0,05
Líquido (em 1g de produto)	0,96 $\pm$ 0,06	0,74 $\pm$ 0,04	0,02 $\pm$ 0,00
Pó (em 1g de produto)	1,01 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,11	0,05 $\pm$ 0,00

A concentração de IgG do produto líquido antes da liofilização foi de 70,85  $\pm$  3,35 g/L. Considerando que o produto líquido apresentou 9,58% de sólidos totais, estimou-se que o teor de IgG em 1 g de produto seco seria de 0,74  $\pm$  0,04g de IgG (análise teórica).

Na análise experimental, 1 g de produto em pó foi diluído em 100 mL de tampão PBS e analisado quanto ao teor de IgG total. A solução apresentou uma concentração de  $15,58 \pm 2,15$  g/L de IgG, o que representou  $0,78 \pm 0,11$ g de IgG em 1 g de produto seco. Portanto, a estimativa do teor de IgG no produto líquido foi equivalente, visto que resultou em valores bem próximos da determinação experimental.

Na Tabela 38 pode-se observar proporções equivalentes de IgG/proteína no produto líquido e em pó. Em ambos os produtos a IgG representa aproximadamente 77% das proteínas totais presentes. Portanto, o conteúdo final de IgG no produto em pó foi de 78%, o que classifica como uma rica fonte IgG bovina. Esse produto tem um alto teor proteico e pode ser classificado como concentrado proteico de soro de colostro. Concentrados proteicos disponíveis no mercado apresentam geralmente na faixa de 35 a 90% de proteínas (ANTUNES, 2003).

Formulações a base de colostro bovino ou imunoglobulinas de colostro bovino já foram registradas. Anderson *et al.* (1998) propôs um suplemento a base de colostro bovino (25%) contendo peróxido de magnésio, vitamina C, bioflavonóides e succinato de magnésio. O suplemento apresentou em sua composição 55% de proteína sendo que, 27% eram compostas pelas imunoglobulinas. Portanto, a porcentagem de imunoglobulinas no produto final foi de 14,85%, inferior a obtida neste estudo.

No Brasil ainda não existe uma regulamentação específica para os suplementos alimentares. A classe de suplementos é somente regulamentada para outras categorias mais específicas como a de suplementos vitamínicos ou de minerais (BRASIL, 1998) e alimentos para atletas (BRASIL, 2010).

#### 3.4. Estabilidade da IgG ao armazenamento

Avaliando-se a estabilidade ao longo de 30 dias de armazenamento a 20-25°C, na ausência de luz, não foram observadas alterações no teor de IgG total (Figura 50). A massa de IgG em 1 g de produto variou de 0,78 a 0,84g.

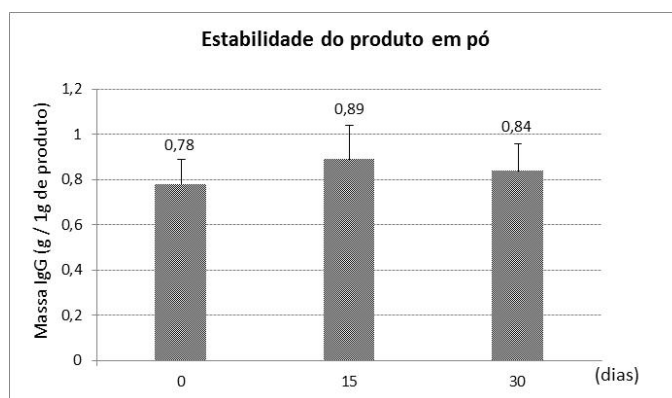


FIGURA 50 – ESTABILIDADE DO PRODUTO EM PÓ AO ARMAZENAMENTO

A análise de variância (Tabela 39) mostrou que não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre o teor de IgG nos tempos 0, 15 e 30 dias de armazenamento.

TABELA 39 – ANOVA PARA A VARIÁVEL IGG - TESTE DE ESTABILIDADE

Fator de Variação	Graus Liberdade	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	Teste F	p-valor
Tratamentos	2	0,05374	0,02687	1,8738	> 0,05
Resíduos	21	0,30115	0,01434		
Total	23	0,35489			

A manutenção da estabilidade é essencial para assegurar a atividade biológica da IgG, garantindo, dessa forma a funcionalidade do produto. Husu *et al.* (1993) relataram que a atividade biológica das imunoglobulinas de colostro imune contra *Campylobacter jejuni* foi mantida por 12 meses após o armazenamento do pó concentrado e liofilizado a diferentes condições de temperatura (4, 20 e 37°C).

### 3.5. Dose recomendada

Segundo Godden (2008) produtos a base de colostro bovino podem estar disponíveis na forma de suplementos ou substitutos de colostro comercializados na forma de pó. Tais produtos devem conter as imunoglobulinas bovinas que podem tanto ser derivados lácteos ou do plasma. A maioria dos suplementos de colostro contém entre 25 a 45 gramas de IgG por dose, devendo ser administrados juntamente com o colostro líquido (não exerce a função de substituto). Quando consumidos sozinhos resultam em menores níveis de imunoglobulinas

séricas. Já os produtos substitutos do colostro deveriam conter no mínimo 100g de IgG por dose, e providenciam uma fonte de proteína, energia, 17 vitaminas e minerais, substituindo completamente o colostro bovino (QUIGLEY *et al.*, 2001). Esses suplementos, no entanto, são utilizados principalmente na medicina veterinária, como medida de controle da falha da transferência passiva em bovinos.

Neste estudo, comparou-se o produto desenvolvido com um produto comercializado - Intact<sup>®</sup> (referência), visto que a sua eficácia já foi relatada em estudos clínicos que demonstraram a melhora na performance e recuperação de atletas. Esse suplemento já foi usado em outro estudo, o qual relatou que o consumo do colostro bovino não afetou a absorção de nutrientes em adultos saudáveis (BRINKWORTH; BUCKLEY, 2003).

Segundo relatos da literatura (BUCKLEY *et al.*, 2009; AHMADI-VINCUI; AHMADI; AHMADI, 2005) e informações disponíveis na base de dados online ([http://www.colostruminfo.com/basic\\_info.html](http://www.colostruminfo.com/basic_info.html)) a dose recomendada de ingestão diária de colostro bovino está entre 20 a 60 gramas. Baseado em informações da literatura e dados experimentais que mostraram uma concentração entre 3 a 10% de IgG no colostro bovino, o consumo de 20 a 60 gramas de colostro providenciaria em média 1,3 a 3,9 gramas de IgG, a qual corresponderia a dose diária recomendada. Tomando-se como base o produto Intact<sup>®</sup> (amplamente comercializado) que tem 75% de proteína, na qual a fração da IgG representa 15% das proteínas, esse produto apresenta uma concentração final de IgG de 11,25%. Logo, para alcançar a dose diária recomendada, estabelecida entre 1,3 e 3,9 g de IgG seria necessário o consumo de 11,56 a 34,67 gramas do produto Intact<sup>®</sup>. Como o produto desenvolvido nesse estudo apresentou 78% de IgG, seriam necessários apenas 1,67 a 5 gramas de produto em pó para suprir a dose diária recomendada. Dessa forma, a quantidade a ser ingerida seria aproximadamente 7 vezes inferior e o produto desenvolvido poderia ser disponibilizado em sachês de 2 a 3 gramas cada, devendo-se estabelecer a dose diária, conforme a sua requerida funcionalidade.

Vale ressaltar que além de testes experimentais *in vivo*, para a comprovação da funcionalidade, fazem-se necessários também testes de alergenicidade e inocuidade a fim de confirmar a segurança do produto.

#### 4. Conclusões

As condições de pasteurização e liofilização testadas não indicaram redução no teor das IgGs. No entanto, quando lioprotetores (EPS) foram empregados na concentração de 0,5% (p/v) observou-se uma maior manutenção da estabilidade das IgGs.

O produto em pó desenvolvido neste estudo apresentou uma alta composição em IgG bovina (78%), com 77% de proteínas totais. Se comparado a produtos comercializados e dados da literatura este produto poderia ser classificado como uma rica fonte de IgG bovina.

Testes de estabilidade confirmaram a manutenção da concentração das IgGs em 30 dias de armazenamento a 20-25°C. Também, foi sugerida uma dose diária inferior (menor que 5 gramas) a recomendada para os produtos já disponíveis no mercado, a fim de se alcançar a sua funcionalidade desejada.

#### Referências

- ABDELWAHED, W. *et al.* Freeze-drying of nanoparticles: formulation, processing and storage considerations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, p. 1688–1713, 2006.
- AHMADI-VINCU, M.; AHMADI, T.; AHMADI, J. Colostrum as nutritional supplement in sport. **Scientific Researches: Agroalimentary Processes and Technologies**, v. XI, p. 33-40, 2005.
- ANDERSON, M. R. *et al.* Colostrum supplement. United States Patent, 5, 846, 569, Dec. 8, 1998.
- ANDO, K. *et al.* Effects of whey preparation processes and heat treatment on bovine colostrum antibody activity. **Milchwissenschaft**, v. 60, p. 67–71, 2005.
- ANTUNES, A.J. Introdução aos concentrados de proteínas do soro (CPS). In: \_\_\_\_ . **Funcionalidade de Proteínas do Soro de Leite Bovino**. Barueri: Manole, 2003, pp. 42.
- BADEL, S.; BERNARDI, T.; MICHAUD, P. New perspectives for lactobacilli exopolysaccharides. **Biotechnology Advances**, v. 29, p. 54-66, 2011.
- BAG, W. Y. Liquid dairy product useful for strengthening immunity, regulating balance of body physiological state and promoting health of human body, comprises milk, bovine colostrum and stabilizing agent. China Patent CN101461422-A, Dec. 21, 2007.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999**. Aprova o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO\\_19\\_1999.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/727a7f004745792d8641d63fbc4c6735/RESOLUCAO_19_1999.pdf?MOD=AJPERES)>. Acesso em 22/05/ 2013.
- BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (SVS) / MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). **Portaria nº 32, de 13 de janeiro de 1998**. Aprova o regulamento técnico para suplementos vitamínicos e ou de minerais. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA\\_32\\_1998.pdf/551775c4-9fc2-4f62-bb62-c7cee757476](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/PORTARIA_32_1998.pdf/551775c4-9fc2-4f62-bb62-c7cee757476)>. Acesso: 22/05/ 2013.



BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução nº 18, de 27 de abril de 2010.** Dispõe sobre alimentos para atletas. Disponível em: < [http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC%2B18\\_2010.pdf/d6815465-e99a-477f-bb35-48b1432b380e](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/394219/RDC%2B18_2010.pdf/d6815465-e99a-477f-bb35-48b1432b380e) >. Acesso: 22/05/ 2013.

BRINKWORTH, G. D.; BUCKLEY, J. D. Bovine colostrum supplementation does not affect nutrient absorptive capacity in healthy young men. **Nutrition Research**, v. 23, p. 1619–1629, 2003.

BUCKLEY, J.D. *et al.* Bovine colostrum supplementation during running training increases intestinal permeability. **Nutrients**, v. 1, p. 224–234, 2009.

CAO, J.; WANG, X.; ZHENG, H. Comparative studies on thermoresistance of protein G-binding region and antigen determinant region of immunoglobulin G in acidic colostrum whey. **Food and Agricultural Immunology**, v. 18, p. 17–30, 2007.

CHELACK, B. J.; MORLEY, P. S., HAINES, D. M. Evaluation of methods for dehydration of bovine colostrum for total replacement of normal colostrum in calves. **Canadian Veterinary Journal**, v. 34, p. 407-412, 1993.

CHEN, C.C.; CHANG, H-M. Effect of thermal protectants on the stability of bovine milk immunoglobulin G. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 3570–3576, 1998.

CHEN, C-C.; TU, Y-Y.; CHANG, H-M. Thermal stability of bovine milk immunoglobulin G (IgG) and the effect of added thermal protectants on the stability. **Journal of Food Science**, v.65, p. 188-193, 2000.

COCKRUM, R. **Composition and method for modulating immune responsiveness.** United States Patent 0198688 A1, Oct. 23, 2003.

COLOSTRUM EUROPE. Disponível em: < <http://www.colostrumeurope.com/about-immulox/> >. Acesso: 22/10/2013.

DANIELLS, S. **Brazil continues to dominate South America health & wellness market**, 2013. Disponível em: < <http://www.nutraingredients-usa.com/Markets/Brazil-continues-to-dominate-South-American-health-wellness-market> >. Acesso: 22/10/2013.

DAVIDSON, G. P. Passive protection against diarrheal disease. **Journal of Pediatric GastroenterologyNutrition**, v. 23, p. 207-212, 1996.

DE RHAM, O.; ISLIKER, H. Proteolysis of bovine immunoglobulins. **Interational Archives of Allergy Applied Immunology**, v. 55, p. 61-69, 1977.

DE VUYST, L.; DE VIN, F.; KAMERLING, J.P. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria. In: KAMERLING, J.P. (ed.). **Comprehensive Glycoscience**, v. 2. Oxford: Elsevier, 2007, pp. 477–518.

DOMINGUEZ, E.; PEREZ, M. D.; CALVO, M. Effect of heat treatment on the antigen-binding activity of anti-peroxidase immunoglobulins in bovine colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 80, p. 3182-3187, 1997.

DUBOIS, M. *et al.* Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Nature**, v. 28, n. 3, p. 350- 356, 1956.

ELFSTRAND, L. *et al.* Immunoglobulins, growth factors and growth hormone in bovine colostrum and the effects of processing. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 879-887, 2002.

FACON, M.; SKURA, B. J.; NAKAI, S. Potential for immunological supplementation of foods. **Food and Agricultural Immunology**, v. 5, p. 85-91, 1993.

FARBER, J. M.; SANDERS, G. W.; MALCOLM, S.A.*et al.* The presence of *Listeria* spp. In raw milk in Ontario. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 95-100, 1988.

- FOLEY, J. A.; OTTERBY, D. E. Availability, storage, treatment, composition, and feeding value of surplus colostrum: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 61, p. 1033-1060, 1978.
- GODDEN, S. Colostrum management for dairy calves. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v. 24, p. 19-39, 2008.
- GODDEN, S. *et al.* Effect of on-farm commercial batch pasteurization of colostrum on colostrum and serum immunoglobulin concentrations in dairy calves. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 1503-1512, 2003.
- GODDEN, S. *et al.* Heat- treatment of bovine colostrum, II: effects of heating duration on pathogen viability and immunoglobulin G. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 3476-3483, 2006.
- GREEN, L.; GODDEN, S.; FEIRTAG, J. Effect of batch and high temperature-short time pasteurization immunoglobulin G concentration in colostrum. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p.246, 2003.
- HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. Processos que utilizam o gradiente de pressão como força motriz. In:\_\_\_\_. **Processos de Separação por Membranas**. Rio de Janeiro: E-papers, 2006, pp. 103-108.
- HUSU, J. *et al.* Production of hyperimmune bovine colostrum against *Campylobacter jejuni*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 74, p. 564-569, 1993.
- INSEL, P.; TURNER, R.E.; ROSS. Sports nutrition: nutrition supplements and ergogenic aids. In: \_\_\_\_\_. **Nutrition**. 2 ed. Sudbury, MA:Jones and Bartlett Publishers, pp. 528-533, 2004.
- KELLY, C. P. *et al.* Survival of anti-*Clostridium difficile* bovine immunoglobulin concentrate in the human gastrointestinal tract. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 236-241, 1997.
- KLOBASA, F.; GOEL, M. C.; WERHAHN, E. Comparison of freezing and lyophilizing for preservation of colostrum as a source of immunoglobulins for calves. **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 923-926, 1998.
- KOTHE, K. N. *et al.* **Method of preparing a solution of lactic or colostric immunoglobulins or both and use thereof**. United States Patent 4,644,056, Feb. 17, 1987.
- KUMMER, A. *et al.* Quantification of bovine IgG in milk using enzyme-linked immunosorbent assay. **Food and Agricultural Immunology**, v. 4, p.93-102, 1992.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.
- LAW, A. J. R. Heat denaturation of bovine, caprine and ovine wheyproteins. **Milchwissenschaft**, v. 50, p. 384–388, 1995.
- LI, S.-Q.; BOMSER, J. A.; ZHANG, H. Q. Effects of pulsed electric fields and heat treatment on stability and secondary structure of bovine immunoglobulin G. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 663–670, 2005.
- LI-CHAN, E. *et al.* Survey of immunoglobulin G content and antibody specificity in cow's milk from British Columbia. **Food and Agricultural Immunology**, v. 6, p. 443-451, 1994.
- LI-CHAN, E. *et al.* Stability of bovine immunoglobulins to thermal treatment and processing. **Food Research International**, v. 28, p. 9-16, 1995.
- LINDNER, J. D. D. *et al.* Fermented foods and human health benefit of fermented functional foods. In: SOCCOL, C. R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. (eds). **Fermentation Processes Engineering in the Food Industry**, 1 ed,v.1. Bosa Roca: Taylor & Francis Inc., 2013, pp. 263-297.
- LINDSTRÖM, P. *et al.* The effect of heat treatment in bovine immunoglobulins. **Milchwissenschaft**, v. 49, p. 67-71, 1994.

- LO, W. C.; KLEIMAN, E. Infant formula past and future: opportunities for improvement. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 63, p. 646S-650S, 1996.
- LOSSO, J. N. *et al.* Detection of antibody specificity of raw bovine and human milk to bacterial lipopolysaccharides using PCFIA. **Food and Agricultural Immunology**, v. 5, p. 231-239, 1993.
- LOVETT, J.; FRANCIS, D. W.; HUNT, J. M. *et al.* Isolation of *Campylobacter jejuni* from raw milk. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 46, p. 459-462, 1983.
- MAEDA, H. *et al.* Effects of an exopolysaccharide (kefir) on lipids, blood pressure, blood glucose, and constipation. **Biofactors**, v. 22, p. 197-200, 2004.
- MAINER, G. *et al.* Kinetic and thermodynamic parameters for heat denaturation of bovine milk IgG, IgA and IgM. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 1034-1038, 1997.
- MAINER, G. *et al.* Effect of heat treatment on anti-rotavirus activity of bovine colostrum. **Journal of Dairy Research**, v. 66, p. 131-137, 1999.
- MANCINI, G.; CARBONARA, A. O.; HEREMSANS, J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry**, v. 2, p. 235-254, 1965.
- MCCLEAD, R. E.; GREGORY, S. A. Resistance of bovine colostral anti-cholera toxin antibody to in vitro and in vivo proteolysis. **Infection and Immunity**, v. 44, p. 474-478, 1984.
- MCMARTIN, S. *et al.* Heat treatment of bovine colostrum, I: effects of temperature on viscosity and immunoglobulin G level. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 2110-2118, 2006.
- MEHRA, R.; MARNILA, P.; KORHONEN, H. Milk immunoglobulins for health promotion. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1262-1271, 2006.
- MIETENS, C.; KEINHORST, H. Treatment of infantile *E. coli* gastroenteritis with specific bovine anti-*E. coli* milk immunoglobulins. **European Journal of Pediatrics**, v. 132, p. 239-252, 1989.
- OHNUKI, H.; OTANI, H. Antigen-binding and protein G-binding abilities of immunoglobulin G in hyperimmunized cow's milk treated under various conditions. **Animal Science Journal**, v. 76, p. 283-290, 2005.
- PAKKANEN, R.; AALTO, J. Growth factors and antimicrobial factors of bovine colostrum. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 285-297, 1997.
- PLETTENBERG, A. *et al.* A preparation from bovine colostrum in the treatment of HIV-positive patients with chronic diarrhea. **The Clinical Investigator**, v. 81, p. 42-45, 1993.
- QUIGLEY, J. D. *et al.* Formulation of colostrum supplements, colostrums replacers and acquisition of passive immunity in neonatal calves. **Journal of Dairy Science**, v. 84, p. 2059-2065, 2001.
- RESMINI, P. *et al.* Thermal denaturation of whey protein in pasteurized milk: fast evaluation by HPLC. **Italian Journal of Food Science**, v. 1, p. 51-62, 1989.
- ROBERFROID, M.B. What is beneficial for health? the concept of functional food, **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 1039-1041, 1999.
- RODRIGUES, K.L.; CARVALHO, J.C.T.; SCHEEDORF, J.M. Anti-inflammatory properties of kefir and its polysaccharide extract. **Inflammopharmacology**, v. 13, p. 485-492, 2005.
- ROOS, N. *et al.* <sup>15</sup>N-labeled immunoglobulins from bovine colostrum are partially resistant to digestion in human intestine. **The Journal of Nutrition**, v. 125, p. 1238-1244, 1995.
- SCAMMEL, A.W. Production and uses of colostrum. **The Australian Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 74-82, 2001.

- STREETER, R. N. *et al.* Isolation of *Mycobacterium paratuberculosis* from colostrum and milk of subclinically infected cows. **American Journal of Veterinary Research**, v. 56, p.1322-1324, 1995.
- STEELE, M. L. *et al.* Survey of Ontario bulk tank raw milk for food-borne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 60, p.1341-1346, 1997.
- SURESH KUMAR, A.; MODY, K; JHA, B. Bacterial exopolysaccharides: a perception. **Journal of Basic Microbiology**, v. 47, p. 103–117, 2007.
- SUTHERLAND, I. W. Bacterial exopolysaccharides. In: KAMERLING, J. P. (ed). **Comprehensive Glycoscience**, v. 2. Oxford: Elsevier, 2007, pp. 521–557.
- TACKET, C. O. *et al.* Protection by milk immunoglobulin concentrate against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. **The New England Journal of Medicine**, v. 12, p.1240-1243, 1988.
- VASCONCELOS, F. de A. G. de. A ciência da nutrição em trânsito: da nutrição e dietética à nutrigenômica. **Revista de Nutrição**, v. 23, p. 935-945, 2010.
- VINDEROLA, G. *et al.* Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* on the gut mucosal immunity. **Cytokine**, v. 36, p. 254-260, 2006.
- WALZ *et al.* Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 9, p. 250-254, 1997.
- WANG, Y. *et al.* Physicochemical properties of exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefiranofaciens* ZW3 isolated from Tibet kefir. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 43, p.283-288, 2008.
- YOLKEN, R. H. *et al.* Antibody to human rotavirus in cow's milk. **New England Journal of Medicine**, v. 312, p. 605-610, 1985.

## CONCLUSÕES GERAIS

O uso de resíduos ou subprodutos agroindustriais é uma prática que têm proporcionado agregação de valor a cadeia produtiva de alimentos e uma diversificação de produtos naturais com propriedades terapêuticas. A riqueza desses produtos em termos nutricionais faz com que estes sejam de interesse para a indústria já que apresentam viabilidade econômica e potencial para suprir a demanda de diversos segmentos de mercado.

Nesse contexto, o colostro bovino é um subproduto da cadeia do leite, e devido a sua rica composição em nutrientes e compostos bioativos, apresenta potencial aplicação no desenvolvimento de novos alimentos funcionais e/ou nutracêuticos. Dessa forma, este estudo buscou selecionar um método econômico e eficaz para o fracionamento/purificação e estabilização de imunoglobulinas G a partir de colostro bovino e desenvolver uma formulação a qual poderia ser destinada a públicos-alvo específicos como, por exemplo, crianças com desordens gastrointestinais, imunodeprimidos e atletas.

No **Capítulo 1** o estudo do perfil físico-químico de 15 amostras de colostro bovino revelou que as maiores variações ocorreram da primeira para a segunda ordenha, sendo que as variáveis mais influenciadas pela ordenha foram o teor de cinzas, proteínas e lactose. Logo, o colostro proveniente da primeira ordenha seria mais apropriado para o desenvolvimento do produto, já que apresentou as maiores concentrações de imunoglobulina G.

O **Capítulo 2** abordou a diversidade bacteriana do colostro bovino, demonstrando o seu potencial para o isolamento de microrganismos probióticos. O estudo enfatizou a utilização de dois métodos para estimar a população bacteriana total presente nas amostras de colostro. Espécies identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rRNA foram confirmadas pela técnica de LH-PCR (como *L. casei*), no entanto, algumas espécies não foram recuperadas nos meios de cultivo. Logo, o uso da técnica LH-PCR mostrou ser efetiva na identificação de espécies que estão presentes, mas são dificilmente cultiváveis, permitindo um estudo mais completo da ecologia bacteriana do colostro bovino.

No **Capítulo 3** foram testadas 4 técnicas para o isolamento/purificação das imunoglobulinas G de colostro bovino. Quando 18 amostras de colostro foram analisadas quanto ao teor de IgG total, estas apresentaram uma alta concentração de IgG (37,59 a 110,25 g/L), demonstrando um bom potencial para o desenvolvimento de um produto a base de IgG. Avaliando-se a reprodutibilidade de 3 *pools* de soro de colostro observou-se que o melhor rendimento (45,5%) foi obtido na recuperação da fração do retentado da membrana de 0,22

um após um processo de filtração. O perfil eletroforético da amostra revelou que este tratamento manteve as bandas de 25 e 50 kDa, confirmando a presença da IgG. Este tratamento foi então selecionado para a elaboração do produto.

Estudos de estabilidade da IgG a processos de pasteurização e liofilização foram apresentados no **Capítulo 4**. As condições de pasteurização testadas não afetaram a concentração das IgGs. Já o uso de lioprotetores, como o EPS na concentração de 0,5% (p/v), poderia auxiliar na manutenção da atividade biológica das IgGs. O produto em pó contendo IgG e EPS apresentou uma alta concentração (78%) de IgG bovina, a qual manteve-se estável em 30 dias de armazenamento a 20-25°C. Comparando-se com produtos de colostro atualmente disponíveis, o produto desenvolvido neste estudo poderia ser administrado em quantidades inferiores (menor que 5 gramas) às recomendadas para produtos já comercializados.

Outras técnicas de isolamento/purificação, bem como, uma otimização das perdas de IgG no processo poderiam resultar num maior rendimento, o qual viabilizaria a produção e escalonamento do produto a base de IgG. Trabalhos futuros poderão direcionar e confirmar o efeito funcional do produto através de estudos *in vivo*, onde a forma de administração e a dose efeito poderão ser determinadas.